

**Molekularer Aufbau und Translokationsmechanismus
des Cag-Typ IV-Sekretionssystems
von *Helicobacter pylori***

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie der

Ludwig-Maximilians-Universität München

- Dr. rer. nat. -

vorgelegt von

Stefan Kutter

Juni 2009

Dissertation eingereicht am: 04. Juni 2009

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Oktober 2009

1. Gutachter: Prof. Dr. Anton Hartmann

2. Gutachter: Prof. Dr. Heinrich Jung

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-von-Pettenkofer Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Leitung von PD Dr. Wolfgang Fischer und Prof. Dr. Rainer Haas angefertigt.

Teile dieser Arbeit sind oder werden unter folgenden Titeln veröffentlicht:

Jiménez-Soto, L. F., S. Kutter, X. Sewald, C. Ertl, E. Weiss, U. Kapp, M. Rohde, T. Pirch, K. Jung, S. F. Retta, L. Terradot, W. Fischer, and R. Haas. (2009) *Helicobacter pylori* type IV secretion apparatus exploits $\beta 1$ integrin in a novel RGD-independent manner. *PLoS Pathogens* (akzeptiert).

Kutter, S., R. Buhrdorf, J. Haas, W. Schneider-Brachert, R. Haas, and W. Fischer. (2008) Protein subassemblies of the cag type IV secretion system revealed by localization and interaction studies. *J. Bacteriol.* **190:2161-2171.**

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|---------------|
| I Einleitung..... | 1 |
| 1. Pathogenese von <i>Helicobacter pylori</i> | 1 |
| 1.1. Entdeckung und Epidemiologie von <i>H. pylori</i> | 1 |
| 1.2. Pathogenese <i>H. pylori</i> -assoziierter Magenerkrankungen..... | 2 |
| 1.3. Virulenzfaktoren von <i>H. pylori</i> und Immunantwort des Wirts | 4 |
| 1.4. Die <i>cag</i> -Pathogenitätsinsel und das CagA-Protein | 6 |
| 2. Typ IV-Sekretion und Pathogenität | 8 |
| 2.1 Vergleich mit anderen Protein-Sekretionssystemen | 8 |
| 2.2 Aufbau von Typ IV-Sekretionssystemen am Beispiel des prototypischen VirB-Systems von <i>A. tumefaciens</i> | 10 |
| 2.3 Das Cag-Typ IV-Sekretionssystem | 12 |
| 2.4 Translokationsmechanismus: Translokationssignal, Sekretionschaperone und Kopplungsproteine | 14 |
| 2.5. Interaktionen des Cag-Systems mit Integrinen als Rezeptoren auf der Wirtszelloberfläche | 16 |
| 3. Ziele der Arbeit..... | 18 |
| II Material und Methoden..... | 19 |
| 1. Material..... | 19 |
| 1.1 Zelllinien | 19 |
| 1.2 Bakterien- und Hefestämme | 19 |
| 1.3 Plasmide | 20 |
| 1.4 Oligonukleotide | 21 |
| 1.5 Antikörper | 24 |
| 1.6 Enzyme und Proteine | 25 |
| 1.7 Molekulargewichtsmarker, Längen- und Gewichtsstandards | 26 |
| 1.8 Nährmedien und Platten | 26 |
| 1.9 Antibiotika und Zusätze für Selektivmedien..... | 27 |
| 1.10 Puffer und Lösungen | 28 |
| 1.11 Chemikalien und Reagenzien..... | 28 |
| 1.12 Verbrauchsmaterialien und Hilfsmittel | 29 |

| | |
|---|-----------|
| 1.13 Apparaturen und Geräte | 29 |
| 1.14 Computerprogramme zur Analyse von Proteinsequenzen | 30 |
| 2. Methoden..... | 31 |
| 2.1 Arbeiten mit Bakterien | 31 |
| 2.1.1 Kultivierung von Bakterien | 31 |
| 2.1.2 Messung der optischen Dichte von Bakterien | 31 |
| 2.1.3 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> - Stämme | 31 |
| 2.1.4 Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> | 32 |
| 2.1.5 Konjugation von <i>E. coli</i> | 32 |
| 2.1.6 Transposonmutagenese | 32 |
| 2.1.7 Transformation von <i>H. pylori</i> | 33 |
| 2.1.8 Elektroporation von <i>H.pylori</i> | 33 |
| 2.1.9 Zellsubfraktionierung von <i>H. pylori</i> | 34 |
| 2.1.9.1 Präparation einer <i>H. pylori</i> -Gesamtmembranfraktion..... | 34 |
| 2.1.9.2 Differentielle Extraktion der Gesamtmembranfraktion | 34 |
| 2.2 Arbeiten mit Hefen..... | 35 |
| 2.2.1 Kultivierung von Hefen..... | 35 |
| 2.2.2 Messung der optischen Dichte von Hefen..... | 35 |
| 2.2.3 Herstellung kompetenter <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämme..... | 35 |
| 2.2.4 Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämmen | 36 |
| 2.2.5 Generierung diploider <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämme durch <i>Mating</i> | 36 |
| 2.2.6 Selektion diploider Hefen nach <i>Mating</i> und Screen auf interagierende Proteine | 37 |
| 2.2.7 β -Galaktosidase Assay | 37 |
| 2.3 Arbeiten mit Zellkulturen..... | 38 |
| 2.3.1 Kultivierung von Zelllinien..... | 38 |
| 2.3.2 Auftauen und Einfrieren von Zelllinien | 38 |
| 2.3.3 Zellzahlbestimmung mit der Neubauer Zählkammer..... | 39 |
| 2.3.4 Infektionsexperimente mit <i>H. pylori</i> : Phosphotyrosin-Assay | 39 |
| 2.3.5 Messung der IL-8 Produktion von AGS-Zellen mittels Sandwich-ELISA..... | 39 |
| 2.4 Arbeiten mit Nukleinsäuren | 40 |
| 2.4.1 Quanti- und qualitative Analyse von DNA | 40 |
| 2.4.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 40 |
| 2.4.3 Präparation von Plasmiden aus <i>E. coli</i> | 41 |
| 2.4.4 Isolierung chromosomaler DNA aus <i>H. pylori</i> | 41 |

| | |
|--|-----------|
| 2.4.5 Analytische und präparative Gelelektrophorese von DNA..... | 42 |
| 2.4.6 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen..... | 42 |
| 2.4.7 Ligation von DNA-Fragmenten | 43 |
| 2.4.8 Rekombinatorische Klonierung nach Gateway®-Technologie | 43 |
| 2.4.9 DNA-Sequenzierung | 45 |
| 2.5 Arbeiten mit Proteinen | 45 |
| 2.5.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen | 45 |
| 2.5.2 Herstellung bakterieller Zelllysate | 45 |
| 2.5.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)..... | 46 |
| 2.5.4 Färben aufgetrennter Proteine mit Coomassie | 46 |
| 2.5.5 Western Blot..... | 47 |
| 2.5.6 Co-Immunopräzipitation | 48 |
| 2.5.7 Test auf Zugänglichkeit von Cystein-Resten in Proteinen..... | 49 |
| III Ergebnisse..... | 50 |
| 1. Untersuchungen zur Wechselwirkung der <i>cag</i>-PAI mit dem Chromosom | 50 |
| 1.1 Herstellung von Deletionsmutanten der Gene <i>hp496</i> und <i>hp511</i> | 51 |
| 1.2 Erzeugung von Mutanten in den Genen <i>hp513-hp519</i> durch Transposonmutagenese | 52 |
| 1.3 Effekte der mutierten Gene auf den Sekretionsapparat..... | 55 |
| 1.3.1 Translokation von CagA | 56 |
| 1.3.2 Auslösung des Hummingbird-Phänotyps..... | 59 |
| 1.3.3 IL-8 Induktion | 61 |
| 2. Charakterisierung des Aufbaus des Cag-Typ IV-Sekretionssystems von <i>H. pylori</i>..... | 62 |
| 2.1 Sequenzanalyse essentieller und akzessorischer Apparatskomponenten zur Sekundärstruktur- und Topologievorhersage | 62 |
| 2.2 Identifizierung weiterer VirB-ähnlicher Komponenten im Cag-System | 64 |
| 2.3 Zelluläre Lokalisierung essentieller Apparatskomponenten | 66 |
| 2.4 Stabilisierungseffekte zwischen Apparatskomponenten | 67 |
| 2.5 Etablierung eines <i>Yeast-Two-Hybrid</i> -Assays zur Untersuchung von Protein-Protein- Wechselwirkungen zwischen <i>cag</i> -PAI-Proteinen | 71 |
| 2.5.1 Klonierung von <i>cag</i> -Genen in <i>Yeast-Two-Hybrid</i> -Vektoren und Transformation in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 71 |
| 2.5.2 Generierung diploider Hefen durch <i>Mating</i> | 72 |
| 2.6 Bestimmung von Protein-Interaktionen mit dem <i>Yeast-Two-Hybrid</i> -Assay | 74 |
| 2.6.1 Arten gefundener Interaktionen | 75 |

| | |
|--|------------|
| 2.6.2 Quantifizierung gefundener Y2H-Proteininteraktionen durch Messung der β -Galaktosidase-Aktivität | 78 |
| 2.7 Identifizierung eines Komplexes des Cag-Typ IV-Sekretionsapparats | 79 |
| 2.8. Nachweis direkter Interaktionen | 82 |
| 2.8.1 CagM interagiert direkt mit CagX | 82 |
| 2.8.2 CagX interagiert direkt mit CagY | 83 |
| 2.8.3 CagM interagiert direkt mit CagT, aber indirekt mit CagY | 84 |
| 2.8.4 CagX und CagY interagieren nur indirekt mit CagT | 85 |
| 3. Studien zum Translokationsmechanismus von CagA..... | 86 |
| 3.1 Y2H-Interaktionen zwischen CagA, seinen Translokationsfaktoren und Apparatskomponenten..... | 86 |
| 3.2 Periplasma-Lokalisierung von CagA | 88 |
| 3.3 Interaktionen von <i>cag</i> -PAI-Apparatskomponenten mit Rezeptoren auf der Wirtszelloberfläche | 91 |
| IV Diskussion | 93 |
| 1. Interaktionen der <i>cag</i>-Pathogenitätsinsel mit dem Chromosom | 93 |
| 2. Der Aufbau des Cag-Typ IV-Sekretionssystems von <i>H. pylori</i> | 97 |
| 2.1 Vergleich mit dem VirB-System von <i>A. tumefaciens</i> | 97 |
| 2.2 Identifizierung eines Cag-Protein-Subkomplexes und Erstellen eines Apparatsmodells | 100 |
| 3. Translokation des CagA-Proteins..... | 103 |
| 3.1 Wechselwirkungen des Sekretionsapparats mit Integrinen als Rezeptoren auf der Wirtszelloberfläche | 103 |
| 3.2 Interaktionen von CagA mit seinen Translokationsfaktoren und Apparatskomponenten | 105 |
| 3.3 Periplasmalokalisierung des CagA-Proteins und Translokationsprozess | 109 |
| V Zusammenfassung | 113 |
| VI Literaturverzeichnis | 115 |
| VII Abkürzungsverzeichnis..... | 143 |
| VIII Anhang..... | 145 |

I Einleitung

1. Pathogenese von *Helicobacter pylori*

1.1. Entdeckung und Epidemiologie von *H. pylori*

Die erste Beschreibung von *Helicobacter pylori* geht ins Jahr 1983 zurück, als Robin Warren und Barry Marshall im Royal Hospital in Perth, Australien, die Bakterien als „*unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis*“ beschrieben (Warren and Marshall, 1983). Sie konnten den Mikroorganismus aus Magenbiopsien von gastroscopisch untersuchten Patienten isolieren und kultivieren. Dabei fanden sie eine eindeutige Korrelation zwischen der Schwere der Erkrankung und der Präsenz und Anzahl der Bakterien (Marshall and Warren, 1984). Durch die Kultivierung dieser Bakterien bei Patienten mit chronischer Gastritis, Magen- und Duodenalulzera zeigte sich ein ätiologischer Zusammenhang, konträr zu der bisherigen Annahme, Magengeschwüre würden allein durch Stress, Rauchen und falsche Ernährung ausgelöst werden. Daher stieß diese Entdeckung in der Fachwelt zunächst auf großen Widerstand, zumal der Magen bislang als nahezu steriles Organ angesehen wurde. Seine kontinuierliche Produktion zähflüssigen Schleims, die Anwesenheit von Immunglobulinen, eine permanente Magenperistaltik und vor allem der niedrige gastrale pH-Wert von 1-3, wurden als effektive Schutzmechanismen vor der Besiedelung mit Mikroorganismen betrachtet. *Helicobacter pylori* hat diese unwirtliche ökologische Nische nicht nur besiedelt, sondern ist in der Lage, in ihr jahrzehntelang zu persistieren.

Zunächst als *Campylobacter pyloridis* bezeichnet, wurde diese Spezies aber später durch Ultrastrukturuntersuchungen und 16S-rRNA-Analysen als Vertreter einer neuen Gattung eingestuft und in *Helicobacter pylori* umbenannt (Romaniuk *et al.*, 1987; Goodwin *et al.*, 1989). Mittlerweile ist eine ganze Reihe verwandter Spezies aus dem Gastrointestinaltrakt verschiedener Tierarten identifiziert und zum Teil auch kultiviert worden, wie beispielsweise *Helicobacter mustelae* aus dem Magen von Frettchen (Fox *et al.*, 1986) oder *Helicobacter felis* aus dem Magen von Katzen (Lee *et al.*, 1988). Auch der menschliche Magen kann von einer weiteren Bakterienart, *Helicobacter heilmannii* (Heilmann and Borchard, 1991), besiedelt werden, die ebenfalls eine milde Gastritis auslöst und mit der Entwicklung von MALT-Lymphomen in Verbindung gebracht wird (Morgner *et al.*, 2000).

Nach erfolgreichen Antibiotikatherapien, mehreren großangelegten Studien und einem spektakulären Selbstversuch, bei dem Marshall die Koch'schen Postulate erfüllte, indem er zeigte, dass die Kolonisierung des Magenepithels durch *H. pylori* zu massiver Gastritis führt (Marshall *et al.*, 1985), ließ sich die Fachwelt vom Zusammenhang der *H. pylori*-Infektion und dem Auftreten von Magengeschwüren überzeugen. Im Jahr 2005 wurden Robin Warren und Barry Marshall für die Entdeckung und Isolierung von *Helicobacter pylori* aus der Magenmukosa von Patienten mit aktiver chronischer Gastritis mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin ausgezeichnet.

Nachdem das Risiko, infolge einer Infektion mit *H. pylori* an einem Adenokarzinom des Magens zu erkranken, um das sechsfache erhöht ist, erklärte die Weltgesundheitsorganisation (WHO) 1994 *H. pylori* zur Klasse I-Karzinogen (Logan, 1994).

Andererseits könnte man jedoch dazu geneigt sein, dieses gram-negative, spiralig gewundene und polar begeißelte Bakterium aufgrund seiner Co-Evolution zwischen Mensch und Bakterium als Kommensalen zu betrachten. Zwar führt die Infektion mit *H. pylori* häufig zu chronischen Entzündungen, sie kann aber auch positive Effekte haben. So tritt ein geringeres

Risiko für die Gastroösophageale Refluxerkrankung (GERD) und den damit verbundenen Speiseröhrenkrebs bei Menschen mit *H. pylori* auf. Dies wird auf eine verminderte Säureproduktion durch die andauernde Infektion mit dem Bakterium zurückgeführt (Vicari *et al.*, 1998). Somit könnte die Besiedlung auch einen Selektionsvorteil für den Menschen dargestellt haben, nachdem *H. pylori* den Menschen und seine Vorfahren schon seit mehr als 60000 Jahren besiedelt (Falush *et al.*, 2003; Linz *et al.*, 2007). Ausgehend von ursprünglichen *Helicobacter*-Spezies in frühen Säugetierarten (Blaser, 1999; Dailidienė *et al.*, 2004) findet sich eine von Afrika ausgehende, weltweite Ausbreitung des Mikroorganismus mit seinem menschlichen Wirt (Covacci *et al.*, 1999; McNulty *et al.*, 2004). Dies lässt den Schluß zu, dass *H. pylori* zumindest teilweise zur Normalflora des Magens gehören könnte.

Die *Helicobacter pylori*-Infektion stellt eine weit verbreitete bakterielle Infektion dar. Epidemiologische Untersuchungen gehen davon aus, dass etwa die Hälfte der Weltbevölkerung mit *H. pylori* infiziert ist. Allerdings variiert die Prävalenz stark in Bezug auf die geographische Region, das Patientenalter, sowie den sozioökonomischen Status (Malaty *et al.*, 1992; Malaty and Graham, 1994). Die Kolonisierungsraten bei Erwachsenen im mittleren Alter sind in den Entwicklungsländern höher (70-90%) als in Industrieländern (25-50%) mit rückläufiger Tendenz (Dunn *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1993). Die Übertragung erfolgt vermutlich während der frühen Kindheit innerhalb der Familie. Als Übertragungsweg kommen oral-orale und fäkal-orale Kontakte zwischen Mutter und Kind in Frage (Lambert *et al.*, 1995; Rowland *et al.*, 1999). Diese Annahme wird durch das gehäufte Auftreten von *H. pylori*-Infektionen innerhalb von Familien sowie die Isolierung von identischen Stämmen bei Mitgliedern einer Familie unterstützt (Bamford *et al.*, 1993; Drumm *et al.*, 1990; Mitchell *et al.*, 1993). Die *H. pylori*-Infektion ist bei Erwachsenen üblicherweise chronisch und heilt nicht ohne eine spezifische Therapie ab. Dagegen scheint eine spontane Eliminierung des Bakteriums in der Kindheit nicht selten zu sein (Suerbaum and Michetti, 2002).

1.2. Pathogenese *H. pylori*-assoziierter Magenerkrankungen

Die Kolonisierung des Magenepithels durch *H. pylori* äußert sich zunächst in der Entstehung einer akuten Gastritis, die histologisch durch die Infiltration neutrophiler Granulozyten, Lymphozyten, Plasmazellen und Monozyten gekennzeichnet ist und auch von einer vorübergehenden Hypochlorhydrie begleitet wird (Sobala *et al.*, 1991). So kann diese anfängliche Besiedelung der Magenschleimhaut durch *H. pylori* zu dyspeptischen Beschwerden führen (Marshall *et al.*, 1985), verläuft aber in der Regel (etwa 90%) asymptomatisch. Die erste Phase der Infektion entwickelt sich meist innerhalb von Monaten zu einer chronischen Entzündung der Magenschleimhaut, was als chronische Gastritis bezeichnet wird. Die Aufrechterhaltung dieser chronischen Entzündung durch den Mikroorganismus führt bei 15-20% der Infizierten zu chronisch aktiver Gastritis (Nomura and Stemmermann, 1993) und weiteren Folgeerkrankungen wie Magen- und Zwölffingerdarmgeschwüren, Magenkarzinomen oder MALT-Lymphomen (MALT, *mucosa-associated lymphoid tissue*) (Atherton, 2006). Der Übergang einer chronischen, *H. pylori*-induzierten, Entzündung zu schwereren Krankheitsbildern wie Gastritis oder gar Krebs zeigt sich oftmals erst nach Jahrzehnten. Schätzungen gehen davon aus, dass *H. pylori* für etwa 5,5% aller menschlichen Krebsfälle verantwortlich ist (Parkin, 2006). Der weitere klinische Verlauf hängt unter anderem von der Lokalisierung der Gastritis im Magen ab (**Abb.I.1**).

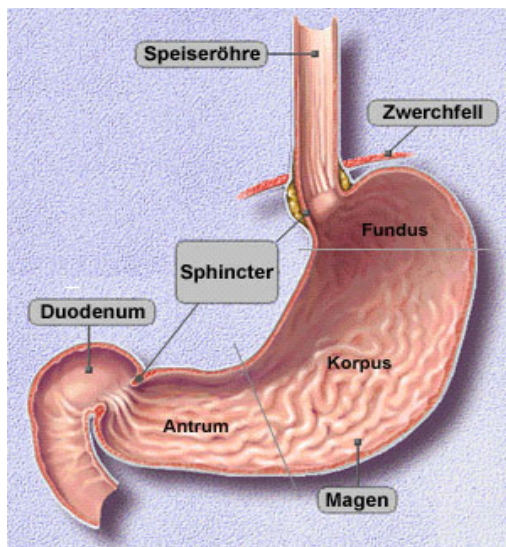


Abb.I.1: Schematische Darstellung des menschlichen Magens. Die Besiedelung durch *Helicobacter pylori* findet in der Antrum- und Korpusregion statt. (nach <http://www.zum.de>)

Es konnte gezeigt werden, dass eine Antrum-dominierende Gastritis zu einer zunehmenden Säureproduktion führt, die zugleich auch die Säurekonzentration im ersten Abschnitt des Duodenums ansteigen lässt. In Folge dessen kann es zu einer gastralen Metaplasie kommen: Die durch Säureeinwirkung zerstörten Zellen des Zwölffingerdarms werden teilweise durch Magenepithelzellen ersetzt (Walker and Dixon, 1996). Eine Infektion dieses Gewebes und die damit einhergehende Ausbreitung der Entzündung werden als Vorstufe eines Zwölffingerdarmgeschwürs (*Ulcus duodeni*) angesehen (Dixon, 2001; Wyatt *et al.*, 1990). Im Falle der Antrum-dominierenden Gastritis, wie sie 15% der infizierten Personen, vor allem in westlichen Ländern, entwickeln, kommt es kaum zur Entstehung von Adenokarzinomen.

Eine Korpus-dominierende, chronisch aktive Gastritis hingegen kann sich zu einer atrophischen Gastritis entwickeln. Die andauernde Entzündung kann hier zur Rückbildung der Drüsenzellen der Mukosa führen. Dadurch werden säuresekretierende Parietalzellen und mukusproduzierende Zellen zerstört und in einigen Fällen durch intestinales Gewebe ersetzt. Diese intestinale Metaplasie gilt als Vorstufe eines Adenokarzinoms (Craanen *et al.*, 1994; Peek, 2002; Correa and Houghton, 2007). Die Entstehung eines Adenokarzinoms des Magens ist zu 70-90% mit einer *H. pylori*-Infektion assoziiert (Ohata *et al.*, 2004; Vieth and Stolte, 2006). Allein die Veränderungen der Magenmukosa aufgrund atrophischer Gastritis erhöhen die Wahrscheinlichkeit für Adenokarzinome um den Faktor 90 (Sipponen and Marshall, 2000). So entwickelt bei diesem Typ der Gastritis, der vor allem in Asien verbreitet ist, etwa 1% der infizierten Personen Adenokarzinome.

Zusätzlich kann aus dem eingewanderten lymphatischen Gewebe in der Magenmukosa, das aus Lymphozyten und Plasmazellen besteht, ein malignes MALT-Lymphom hervorgehen. Bei 90% der an einem MALT-Lymphom erkrankten Personen kann eine *H. pylori*-Infektion nachgewiesen werden (Parsonnet *et al.*, 1994; Wotherspoon, 1998).

Der Verlauf einer Infektion hängt aber auch stark vom infizierenden *H. pylori*-Stamm, insbesondere von den vorhandenen Virulenzfaktoren, und von einer Vielzahl von Wirtsfaktoren, wie genetischer Prädisposition, der Immunantwort auf die Infektion und der Ernährungsweise ab. Gerade die Virulenzfaktoren *cag*-Pathogenitätsinsel mit dem translozierten Effektorprotein CagA (Cytotoxin assoziiertes Gen A), das vakuolisierende Zytotoxin VacA, sowie das Adhäsins BabA, die in den nächsten Kapiteln eingehender

beschrieben werden, sind signifikant mit der Ausbildung einer atrophischen Gastritis und Adenokarzinomen verknüpft (Correa and Houghton, 2007). Auch das Vorhandensein bestimmter Interleukin (IL)-1 β -Allele auf der Wirtsseite, die mit einer übermäßigen IL-1 β Zytokinproduktion einhergehen, verursacht eine stärkere Entzündungsreaktion und erhöht somit das Risiko einer atrophischen Gastritis (El-Omar *et al.*, 2000). Diese Situation kann durch weitere Risikofaktoren wie Nikotin, Alkohol und Stress verschärft werden.

1.3. Virulenzfaktoren von *H. pylori* und Immunantwort des Wirts

Um erfolgreich den menschlichen Magen besiedeln zu können, benötigt *H. pylori* eine Vielzahl von Kolonisierungs- und Virulenzfaktoren, zumal dieses Habitat durch seinen geringen pH-Wert und das Vorhandensein von Proteasen sehr lebensfeindlich ist. Um im sauren Magenlumen überleben zu können, besitzt *H. pylori* eine Urease mit sehr hoher Aktivität. Diese besteht aus einem Oligomer der UreA-Untereinheit (30 kDa) und UreB (62 kDa) (Dunn *et al.*, 1990). Die Urease hält im Inneren des Bakteriums einen neutralen pH-Wert aufrecht, indem sie Harnstoff in Hydrogencarbonat und Ammoniak spaltet. Letzterer puffert einströmende Protonen und ermöglicht damit eine Aufrechterhaltung des Membranpotentials (Rektorschek *et al.*, 1998). In diesem Zusammenhang spielt auch das UreI-Protein eine wichtige Rolle, das einen Protonen-kontrollierten Harnstoffkanal darstellt, der sich bei niedrigem pH-Wert öffnet und die Ureaseaktivität moduliert (Weeks *et al.*, 2000). Somit gelingt es *H. pylori* zumindest eine Zeitlang im sauren Milieu zu überleben (Stingl *et al.*, 2002). Um vom Magenlumen zur Epitheloberfläche zu gelangen und damit dem Angriff der Magensäure zu entgehen, besitzt *H. pylori* 2-7 unipolar angeordnete Flagellen, die aus den Untereinheiten FlaA und FlaB bestehen (Leying *et al.*, 1992; Suerbaum *et al.*, 1993) und von einer Membranscheide umhüllt sind, die noch weitere Proteine enthält (Jones *et al.*, 1997). Die Orientierung erfolgt über einen pH-Gradienten, da unter der schützenden Schleimschicht ein Bicarbonat-gepuffertes Milieu mit einem pH-Wert von 6-7 vorherrscht (Schreiber *et al.*, 2004). Unterstützend ist hier sicherlich auch die spiralförmige Form der Bakterien, um den hochviskosen Mukus effektiv durchdringen zu können. Sowohl die Urease als auch die Motilität sind essentiell für die Kolonisierung, wie im Tiermodell gezeigt werden konnte (Eaton *et al.*, 1991 and 1992). Untersucht man die Verteilung der Bakterien im Tiermodell innerhalb der Mukusschicht, so findet sich der größte Teil frei schwimmend, nahe dem Epithel (Schreiber *et al.*, 1999). Auch zeigt sich in humanen Magenbiopsien, dass nur etwa 20% der *H. pylori*-Population an Epithelzellen adhärieren (Hessey *et al.*, 1990). Dabei ist die Bindung an Epithelzellen für das Überleben von *H. pylori* essentiell. Einerseits wird ein Abdriften in das Magenlumen durch die Peristaltik und die Erneuerung der Magenmukosa vermieden, andererseits ist eine Bindung Voraussetzung für die Translokation von Pathogenitätsfaktoren und die Induktion einer Entzündungsreaktion. Auch spielt die Adhäsion eine Rolle bei der Gewinnung essentieller Membranbestandteile wie Cholesterin (Wunder *et al.*, 2006). Die Adhärenz wird über verschiedene Proteine der OMP-Familie (*outer membrane protein*) vermittelt. Insgesamt wurden 32 miteinander verwandte Proteine identifiziert (Tomb *et al.*, 1997) von denen BabA das dominierende Adhäsins von *H. pylori* darstellt (Ilver *et al.*, 1998, Prinz *et al.*, 2001). Es bindet an das fucosylierte Blutgruppenantigen Lewis b (Le^b) auf der Oberfläche von Magenepithelzellen (Boren *et al.*, 1993, Aspholm-Hurtig *et al.*, 2004) und wird mit dem Auftreten von Ulkus und Magenkarzinomen in Verbindung gebracht (Gerhard *et al.*, 1999). Unabhängig davon sind für die Bindung an Magenbiopsieschnitte die Proteine AlpA und AlpB notwendig, für die noch kein Rezeptor gefunden werden konnte (Odenbreit *et*

al., 1999). Als weiteres Adhäsins konnte SabA identifiziert werden (Aspholm *et al.*, 2006), das ebenfalls wie BabA Blutgruppenantigene erkennt. Allerdings handelt es sich hier um sialylierte Glykoproteine (Sialyl-Lewis^x), wie sie hauptsächlich auf entzündetem Gewebe vorliegen (Mahdavi *et al.*, 2002; Ota *et al.*, 1998a and b).

Charakteristisch für das entzündete Magenepithel infizierter Personen ist ein erhöhter Spiegel an IL-1 β , IL-8, IL-6 und TNF- α (Crabtree *et al.*, 1994; Yamaoka *et al.*, 1997; Lindholm *et al.*, 1998). Darunter scheint IL-8 eine zentrale Rolle zu spielen, dient es doch als potentes Chemoattraktants für neutrophile Granulozyten und andere Effektorzellen des angeborenen Immunsystems, die zusätzlich durch das von *H. pylori* gebildete „*H. pylori* neutrophil activating protein“ (HP-NAP) angelockt werden (Polenghi *et al.*, 2007). HP-NAP beeinflusst die Immunantwort durch Modulation des Zytokin-Musters von Leukozyten (Amedei *et al.*, 2006), was zur Polarisierung der Immunantwort vom Typ T_H1 beiträgt. T_H1-Lymphozyten (T_H=T-Helferzellen) produzieren hauptsächlich IFN- γ , TNF- β und IL-2 und fördern die zelluläre Immunantwort. T-Zellen vom Typ T_H2 bilden vermehrt IL-4, IL-5 und IL-13 und dienen so als Wachstums- und Differenzierungsfaktor für Antikörper-produzierende B-Zellen und damit einer humoralen Immunreaktion. Zellen vom Subtyp T_H0 weisen keine Polarisierung in ihrem Zytokinprofil auf (Del Prete, 1998; Mosmann and Sad, 1996). Aus Biopsien isolierte, *H. pylori*-spezifische, T-Lymphozyten entsprachen aufgrund der gebildeten Zytokine (IL-12, IFN- γ , TNF- α) dem Subtyp T_H1 (Bamford *et al.*, 1998; D’Elios *et al.*, 1997). Die Populationsgröße dieser T-Zellen beträgt im Falle einer oberflächlichen Gastritis etwa 30% T_H1-Zellen und über 50% T-Zellen vom Typ T_H0. T_H2-Zellen sind kaum vorhanden. Biopsien von Patienten mit Magengeschwüren zeigen, dass sogar mehr als 80% der T-Zellen dem Subtyp T_H1 angehörten (D’Elios *et al.*, 2003). Eine dominante T_H1-Polarisierung ist vermutlich mit einem schwereren Krankheitsverlauf assoziiert und ein Grund für das Unvermögen des Wirtsorganismus, eine *H. pylori*- Infektion zu eliminieren. Gerade der Aufbau einer T_H2-Antwort wäre aber notwendig, um *H. pylori* im Rahmen von Vakzinierungsstudien zu eradizieren (Aebischer *et al.*, 2000; Ermak *et al.*, 1998; Lucas *et al.*, 2001; Saldinger *et al.*, 1998), da T_H2-Zytokine protektiv gegenüber einer Entzündung wirken (Smythies *et al.*, 2000). Aber auch der Beitrag einer humoralen Antwort bei der Infektion mit *H. pylori* ist noch unklar. Zwar finden sich Antikörper gegen *H. pylori*-Antigene mit erhöhtem Titer bei fast allen infizierten Patienten, allerdings unterscheiden sich die Titer nicht zwischen Patienten ohne Symptomen und bei solchen mit Magengeschwüren (Mattsson *et al.*, 1998a and b). Eine Eliminierung von *H. pylori* findet jedoch nicht statt und kann weder durch Opsonierung noch durch Komplement-induzierte Lyse erreicht werden (Rautemaa *et al.*, 2001). Stattdessen akkumulieren Makrophagen und Granulozyten, welche wiederum die Entzündung vorantreiben und so die Mukosa schädigen (Crabtree *et al.*, 1993; Sobala *et al.*, 1991). Dies nützt dem Bakterium möglicherweise, indem eine bessere Nährstoffzufuhr über die durchlässigere Epithelbarriere erreicht werden kann.

Um sich vor den Reaktionen des Wirts und seines Immunsystems zu schützen und diese zu beeinflussen, besitzt *H. pylori* noch zwei weitere (Haupt-) Virulenzfaktoren, nach deren Vorhandensein die Bakterien in verschiedene Stämme eingeteilt werden. Es handelt sich hierbei um das vakuolisierende Zytotoxin VacA und das CagA-Protein, das, zusammen mit dem für seine Translokation in Wirtszellen verantwortliche Cag-Typ IV-Sekretionssystem, auf der sogenannten *cag*-Pathogenitätsinsel im Chromosom virulenter *H. pylori*-Stämme kodiert ist und seinen Namen der Korrelation mit VacA verdankt.

VacA gehört zur Familie der Autotransporter, wird in den Kulturüberstand sekretiert (Fischer *et al.*, 2001a), und bildet als charakteristisches Merkmal große zytoplasmatische Vakuolen in Epithelzellen (Leunk *et al.*, 1988). Nähere Sequenzuntersuchungen offenbarten das Vorhandensein verschiedener Allele, die sich durch Polymorphismen im Bereich des 5'-Endes (s-Region) und in einem mittleren Bereich (m-Region) auszeichnen (Atherton *et al.*, 1999; McClain *et al.*, 2001). Aufgrund dieser Eigenschaften werden *H. pylori*-Stämme als Typ 1 (mit s1/m1-VacA) und Typ 2-Stämme (s1/m2) eingeteilt. Typ 1-Stämme weisen im Gegensatz zu Typ 2-Stämmen ein deutlich höheres Risiko für die Ausbildung von Magengeschwüren und Adenokarzinomen auf. Außerdem besitzen sie im Gegensatz zu Typ 2-Stämmen zusätzlich die *cag*-Pathogenitätsinsel mit CagA als Effektorprotein.

Aufgrund seiner vielfältigen Effekte auf Magenepithelzellen wie auch auf Immunzellen wurde VacA als multifunktionales Toxin bezeichnet (Cover and Blanke, 2005). Neben der Vakuolisierung werden als weitere Effekte auf Epithelzellen die Störung des Vesikeltransports (Satin *et al.*, 1997), eine Inhibition der Epithelzellproliferation (Ricci *et al.*, 1996) und die Induktion der Apoptose (Cover *et al.*, 2003; Galmiche *et al.*, 2000; Kuck *et al.*, 2001) beschrieben. Auch zeigen immer mehr Studien, dass VacA Einfluß auf Zellen des Immunsystems nimmt. Bei B-Zellen beispielsweise inhibiert es die Prozessierung und Präsentation von Antigenen (Molinari *et al.*, 1998). Weiterhin scheint VacA auch die Reifung von *H. pylori*-enthaltenden Phagosomen in Makrophagen zu behindern (Zheng and Jones, 2003), was zur Verschmelzung von sogenannten Megasomen führt und ein effektives Abtöten der Bakterien verhindert (Allen *et al.*, 2000). Außerdem inhibiert VacA das Wachstum von T-Zellen und verhindert deren Aktivierung durch Hemmung der IL-2-Expression (Boncristiano *et al.*, 2003; Gebert *et al.*, 2003; Sundrud *et al.*, 2004).

1.4. Die *cag*-Pathogenitätsinsel und das CagA-Protein

Die *cag*-Pathogenitätsinsel stellt eine 37 kb große Region im Genom von *H. pylori*-Typ I-Stämmen dar, die in das chromosomale Glutamatracesegmen integriert ist und wahrscheinlich durch horizontalen Gentransfer erworben wurde (Censini *et al.*, 1996). Es finden sich typische Merkmale einer Pathogenitätsinsel (PAI) wie ein niedrigerer GC-Gehalt gegenüber dem restlichen Genom, die flankierenden direkten 31 bp-Sequenzwiederholungen und das Vorhandensein von Insertionssequenzen (IS605-Elemente) (Fetherston *et al.*, 1992; Hacker *et al.*, 1997). Die 27 putativen Gene codieren für das Cag-Typ IV-Sekretionssystem und dessen Substrat CagA. Im Folgenden sollen die Funktionen dieses Sekretionssystems anhand der beiden Phänotypen, nämlich der Translokation von CagA und der Induktion einer IL-8-Immunantwort näher beschrieben werden.

Zunächst ist der Sekretionsapparat für die Translokation des Effektorproteins CagA in Epithelzellen und Immunzellen verantwortlich (Odenbreit *et al.*, 2000). Durch die Duplikation interner Gensequenzen variiert die Größe des CagA-Proteins je nach *H. pylori*-Stamm zwischen 128 und 145 kDa (Covacci *et al.*, 1993). Nach Translokation in Wirtszellen wird CagA durch Protein-Tyrosinkinasen der Src-Familie (c-Src, Lyn) an Tyrosinresten phosphoryliert. In Zellen des Immunsystems, wie Phagozyten oder dendritischen Zellen, wird CagA in ein stabiles 100 kDa-Fragment und ein tyrosinphosphoryliertes 40 kDa-Fragment gespalten (Odenbreit *et al.*, 2001). Die Tyrosin-Phosphorylierung findet an sogenannten EPIYA-Motiven statt (bestehend aus den Aminosäuren Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala), die in variabler Anzahl in einer C-terminalen Region vorkommen (Backert *et al.*, 2001). Aufgrund homologer

Rekombination innerhalb des *cagA*-Gens sind vier verschiedene EPIYA-Varianten (EPIYA A-D) bekannt (Higashi *et al.*, 2002a and 2005; Naito *et al.*, 2006). Die C- und D-Varianten sind hauptsächlich Gegenstand der Phosphorylierung. In diesem Zusammenhang konnte ebenfalls gezeigt werden, dass auch Abl-Kinasen (c-Abl, Arg) die EPIYA-Motive direkt phosphorylieren können (Poppe *et al.*, 2007; Tammer *et al.*, 2007).

Phosphoryliertes CagA bindet die Tyrosin-Phosphatase SHP-2, die Tyrosinkinase Csk und das Adaptorprotein Crk (Higashi *et al.*, 2002b; Tsutsumi *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2005), alles Proteine mit sogenannten SH2-Domänen (*src homology 2*), die eine Rolle in den durch *H. pylori*-induzierten Aktin-Zytoskelettarrangements spielen, die als *hummingbird*-Phänotyp beschrieben werden (Segal *et al.*, 1997 and 1999). Dieser Phänotyp stellt eine morphologische Veränderung der Zellen dar, die durch dramatische Zellelongation charakterisiert ist und auch mit der Induktion erhöhter Zellmotilität einhergeht (Moese *et al.*, 2004). Die Interaktion mit SHP-2 zieht einerseits die Inaktivierung der *focal adhesion kinase* (kurz FAK) nach sich (Higashi *et al.*, 2002b; Tsutsumi *et al.*, 2006) und andererseits trägt die Aktivierung des Erk-Signalwegs durch aktivierte SHP-2 ebenfalls zur induzierten Zellelongation bei (Higashi *et al.*, 2004). Auch sind an diesem Phänotyp die Aktin-bindenden Proteine Cortactin, Ezrin und Vinculin beteiligt (Selbach *et al.*, 2003 and 2004; Moese *et al.*, 2007). Phosphoryliertes CagA inaktiviert Src entweder direkt oder über die Rekrutierung von Csk, einem negativen Regulator von Src (Selbach *et al.*, 2003; Tsutsumi *et al.*, 2003). Schließlich kann durch die Interaktion mit CrkII und die Aktivierung der Abl-Kinase, Rac1 zur Aktin-Reorganisation aktiviert werden (Suzuki *et al.*, 2005; Brandt *et al.*, 2007; Poppe *et al.*, 2007; Tammer *et al.*, 2007).

Interaktionen von CagA in seiner unphosphorylierten Form beeinflussen hingegen die Integrität von Kontaktstellen benachbarter Epithelzellen, den sogenannten „*tight junctions*“ und dies kann zum Aufbrechen der Barrierefunktion des Magenepithels führen. Dabei assoziiert CagA mit dem Gerüstprotein ZO-1 der epithelialen *tight junctions* und dieses wird zusammen mit dem Transmembranprotein JAM zur Bindungsstelle zwischen *H. pylori* und der Epithelzelle rekrutiert (Amieva *et al.*, 2003). Später spielt die Kinase Par1, ein zentraler Regulator der Zellpolarität, eine Rolle in diesem Prozess: CagA bindet und inhibiert diese direkt, um den Verlust der Zellpolarität zu fördern (Saadat *et al.*, 2007; Zeaiter *et al.*, 2007). Schließlich interagiert CagA noch mit dem Protein E-Cadherin, das bei Zell-Zell-Kontakten eine wichtige Rolle spielt (Murata-Kamiya *et al.*, 2007). Die Folge all dieser Prozesse ist die Destabilisierung des Magenepithels, die zur Pathogenese von *H. pylori* beiträgt.

Als weiteres Zielmolekül von unphosphoryliertem CagA konnte das Adaptorprotein Grb2 identifiziert werden (Mimuro *et al.*, 2002). Die Bindung von CagA an Grb2 führt zur Aktivierung des Ras/Raf/Mek/Erk-Signalweges, was zur verstärkten Proliferation und morphologischen Veränderungen in Epithelzellen führt. Ebenfalls wird so auch der proinflammatorische Transkriptionsfaktor NF- κ B aktiviert (Brandt *et al.*, 2005). Einen weiteren Transkriptionsfaktor, der durch unphosphoryliertes CagA aktiviert wird, stellt β -Catenin/LEF dar. Die Akkumulierung im Zellkern von β -Catenin führt zur transkriptionellen Hochregulierung mitotischer Gene, die mit der Karzinogenese in Verbindung gebracht werden (Franco *et al.*, 2005).

Diese zahlreichen Auswirkungen auf Signalwege und die Korrelation zwischen der Expression von CagA und der Ausbildung von Magenkarzinomen, führen dazu, dass CagA als bakterielles Onkoprotein bezeichnet werden kann. Diese Ansicht kann durch eine kürzlich veröffentlichte Arbeit aus der Gruppe von Hatakeyama (Ohnishi *et al.*, 2008) unterstützt werden, in der die Ausbildung von Magenkarzinomen in CagA-transgenen Mäusen

beschrieben wird. Diese, in jeder Körperzelle CagA exprimierenden Mäuse, wiesen eine abnorme Proliferation des Magenepithels und hämatopoetischer Zellen auf. Transgene Mäuse hingegen, die CagA ohne EPIYA-Motiv exprimierten, wiesen keinerlei Veränderungen auf. Dies unterstreicht wiederum die Bedeutung der Interaktion von CagA mit SHP-2 bei der Ausbildung von Adenokarzinomen.

Eine weitere Funktion des Cag-Typ IV-Sekretionsapparats ist die kontaktabhängige Induktion proinflammatorischer Zytokine in Epithelzellen, vor allem von IL-8 (Censini *et al.*, 1996; Rieder *et al.*, 1997). Allerdings konnte der Mechanismus bisher nur teilweise geklärt werden. Es scheint ein intaktes Typ IV-Sekretionssystem zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und somit der IL-8 Induktion notwendig zu sein, da nach Deletion einzelner apparatskodierender Gene in Infektionsexperimenten keine IL-8-Induktion mehr nachweisbar war (Fischer *et al.*, 2001b). Nach der Rezeptor-Hypothese wird durch die Bindung des Apparats an die Zelloberfläche die Signaltransduktion zur Induktion von IL-8 ausgelöst. Eine Translokation von CagA hat im Stamm 26695 keinen Einfluß auf die Induktion von IL-8 (Crabtree *et al.*, 1995; Rieder *et al.*, 1997; Fischer *et al.*, 2001b). Inzwischen wird auch vermutet, dass die IL-8 Induktion von Peptidoglykan-Bruchstücken, die durch den Translokationskanal übertragen werden, ausgelöst wird (Viala *et al.*, 2004). Bei diesem Prozess spielt Nod1 eine Rolle, ein intrazellulärer Erkennungsfaktor mit Spezifität für gramnegatives Peptidoglykan, der zur Aktivierung der NF- κ B-abhängigen, proinflammatorischen Antwort führt. Zusätzlich scheint auch das Protein OipA (*outer inflammatory protein A*), aber *cag*-PAI-unabhängig, an der IL-8-Induktion beteiligt zu sein (Yamaoka *et al.*, 2000).

Die molekularen Mechanismen und notwendigen Interaktionen, die dem CagA-Translokationsprozess zugrunde liegen, sind im Cag-Typ IV-Sekretionssystem noch weitgehend unbekannt. Andere Systeme zur Proteinsekretion oder -translokation sind hingegen schon wesentlich besser untersucht.

2. Typ IV-Sekretion und Pathogenität

2.1 Vergleich mit anderen Protein-Sekretionssystemen

Das Beispiel der Typ IV-Sekretion mittels des Cag-Systems von *Helicobacter pylori* veranschaulicht, dass die spezifische und koordinierte Sekretion pathogenetisch relevanter Proteine oftmals einen Schlüsselprozess für eine effiziente Pathogenese darstellt. Daher haben besonders pathogene Bakterien, aber auch andere Bakterien, Transportsysteme entwickelt, um Substrate in das extrazelluläre Milieu zu sekretieren oder direkt in Wirtszellen zu schleusen. Generell besteht die Sekretion entweder aus einem Mechanismus bei dem die Zellhülle in einem Schritt überwunden wird oder aus einem zweistufigen Prozess, bei dem die äußere Membran durch eine spezifische Maschinerie überbrückt wird. Bakterielle Proteinsekretionssysteme werden auf dieser Grundlage anhand einer numerischen Klassifikation eingeteilt (Thanassi and Hultgren, 2000). Bei den einstufigen Typ I-Systemen, die auch ABC-Transporter (*ATP binding cassette*) genannt werden, findet die Sekretion durch eine einfache Maschinerie statt, die die gesamte Zellhülle durchspannt. Das Translokon besteht normalerweise aus drei Komponenten, die eine Kanalstruktur zwischen Zytoplasma und extrazellulärem Milieu bilden (Holland *et al.*, 2005). Die Substrate für die zweistufigen

Typ II-Systeme enthalten Signalsequenzen für den Export ins Periplasma über das allgemeine Sec-System oder alternativ das Tat-System (*Twin-arginine translocation*). Nach Faltung des Proteins im Periplasma erfolgt die Translokation über die äußere Membran über eine komplexe Struktur namens Sekreton. Dieses besteht aus dem Sekretin, einer konservierten Pore in der äußeren Membran und einer pilus-ähnlichen Struktur in der inneren Membran, die als Kolben agieren könnte, um das Substrat durch das Sekretin zu drücken (Johnson *et al.*, 2006). Auch Typ V-Systeme benutzen einen zweistufigen Mechanismus, bei dem die Sec-Maschinerie für den Transport über die innere Membran benützt wird (Henderson *et al.*, 2004). Eine Translokationsdomäne mit β -Faltblattstruktur, die bei der Autotransporter-Variante im sekretierten Protein vorhanden ist, oder im Zwei-Partner-Sekretionsweg als separate Einheit exprimiert ist, wird zur Translokation über die äußere Membran benötigt, indem sie mit dieser Domäne in die Membran inseriert. Typ VI-Systeme werden für die Sekretion bestimmter Virulenzfaktoren in *Vibrio cholerae* (Pukatzki *et al.*, 2006) und *Pseudomonas aeruginosa* benötigt (Mougous *et al.*, 2006). Die Substrate werden ohne Sec-Signalsequenz synthetisiert, was eine Unabhängigkeit vom Sec- oder Tat-Transportweg andeutet. Die Bezeichnung „Typ VI“ wurde allerdings auch für die Sekretion von Zellmaterial durch Abschnüren von Vesikeln der äußeren Membran verwendet. Nachdem auch periplasmatische Transportproteine bei diesem Prozess beteiligt sein könnten und die Spezifität der rekrutierten Proteine noch unklar ist, erscheint diese Bezeichnung noch etwas verfrüht. Kürzlich konnte ein weiteres Proteinsekretionssystem bei Mycobakterien entdeckt werden, das aufgrund seiner einzigartigen Komposition und seiner generellen Bedeutung für diese Bakterien als Typ VII-System klassifiziert wurde. Es ist spezialisiert für den Transport von extrazellulären Proteinen über die hydrophoben und höchst undurchlässigen Zellwände dieser Bakterien. Auch konnte eine Beteiligung in der Virulenz pathogener Mycobakterien gezeigt werden (Abdallah *et al.*, 2007).

Im Gegensatz zu den bislang beschriebenen Transportsystemen, geht es bei Typ III- und Typ IV-Systemen nicht nur um Sekretion in das umgebende Medium, sondern auch um einen direkten, kontaktabhängigen Transport von Effektorproteinen in eukaryontische Zielzellen. Beide Systeme stellen eine Strategie verschiedener gramnegativer Mikroorganismen dar, um Infektionen zu etablieren. Während Typ III-Sekretionssysteme eine phylogenetische Verwandtschaft zu den Multiproteinkomplexen bakterieller Flagellen zeigen (Macnab, 1999), stammen Typ IV-Systeme von Proteinkomplexen ab, die den konjugativen Transfer von DNA vermitteln (Zechner *et al.*, 1999).

Eine Vielzahl von Typ III-Sekretionssystemen wurde in tierpathogenen Spezies wie Salmonellen, enteropathogenen *E. coli* oder *Pseudomonas aeruginosa*, aber auch in pflanzenpathogenen Mikroorganismen, wie *Ralstonia solanacearum* oder *Erwinia amylovora*, identifiziert (Cornelis, 2002 and 2006). Unter diesen stellt das Ysc-System (*Yop secretion*) in *Yersinia* das am besten untersuchte Typ III-System dar. Dieses zeichnet sich durch ein sogenanntes Injektisom aus, das eine Nadel-ähnliche Struktur darstellt, die die gesamte Zellhülle durchdringt und sich zum Kontakt mit der Wirtszelle ausdehnt. Die Beschaffenheit dieser Struktur erlaubt die direkte Injektion von Virulenzfaktoren aus dem bakteriellen Zytoplasma in die Wirtszelle. Der Sekretionsapparat wird von etwa 20 verschiedenen Proteinen ausgebildet (Cornelis *et al.*, 2006). Wie bei den Typ II-Systemen befindet sich in der äußeren Membran ein Sekretin, das ringförmige Komplexe mit großem Innendurchmesser auszubilden vermag und durch ein Lipoprotein unterstützt wird (Koster *et al.*, 1997; Johnson *et al.*, 2006; Yip and Strynadka, 2006). Die meisten Komponenten

befinden sich in der inneren Membran und bilden einen Komplex aus, der dem Flagellen-Basiskörper entspricht (Hueck, 1998). Interessanterweise konnte für *Yersinia enterocolitica* gezeigt werden, dass der Flagellenapparat nicht nur analog zu den Typ III-Sekretionssystemen aufgebaut ist, sondern auch Virulenzproteine sekretieren kann (Young *et al.*, 1999). Für die Translokation ins Zytoplasma der Wirtszelle ist noch eine weitere Klasse von Proteinen, die sogenannten Translokatoren, notwendig. Diese inserieren in die Wirtszellmembran und bilden so einen Kanal für den Proteintransfer (Neyt and Cornelis, 1999).

2.2 Aufbau von Typ IV-Sekretionssystemen am Beispiel des prototypischen VirB-Systems von *A. tumefaciens*

Typ IV-Sekretionssysteme sind Makromolekül-Transporter mit einem breiten Spektrum an Substraten und Zielzellen (Cascales and Christie, 2003). Individuelle Systeme haben sich den verschiedenen Anforderungen wie beispielsweise der Proteinsekretion, der Nukleoproteinsekretion oder der Aufnahme von DNA angepasst. Sie können genetisch aufgrund von Sequenzhomologien in zwei verschiedene Klassen eingeteilt werden, Typ IVA- und Typ IVB-Systeme (Christie and Vogel, 2000; Sexton and Vogel, 2002). Das prototypische VirB/D4 Sekretionssystem von *A. tumefaciens* aus der Klasse der Typ IVA-Systeme besteht aus 11 VirB-Proteinen, die für den Aufbau des Sekretionsapparats nötig sind, aber zusätzliche Faktoren, wie das Kopplungsprotein VirD4, das Sekretionschaperon VirE1 oder die periplasmatischen Proteine VirJ und AcvB werden ebenfalls zum Transfer der Substrate benötigt (Cascales and Christie, 2003). Die 12 typischen Komponenten des VirB-Systems (VirB1-VirB11 und VirD4) lassen sich in drei funktionelle Kategorien einteilen. Zunächst gibt es energetisierende Komponenten wie VirB4, VirB11 und VirD4, die durch ihre ATPase-Funktion Energie für die Substrattranslokation und/oder den Apparatsaufbau bereitstellen. VirD4-ähnliche Proteine werden als Kopplungsproteine beschrieben, weil sie den Transfer der Substrate zum Sekretionsapparat über die Bindung an VirB10-ähnliche Komponenten des Apparats vermitteln (Gilmour *et al.*, 2003; Llosa *et al.*, 2003). Sie kommen nicht in allen Typ IV-Systemen vor. Von VirB4, VirB11 und VirD4 wurde außerdem gezeigt, dass sie in *A. tumefaciens* miteinander interagieren, was Rückschlüsse auf eine koordinierte Aktion der energetisierenden Komponenten erlaubt (Atmakuri *et al.*, 2004).

In der zweiten Kategorie finden sich die Apparatskomponenten (VirB1, VirB6, VirB7, VirB8, VirB9 und VirB10). VirB6, VirB8 und VirB10 bilden einen Komplex in der inneren Membran und bilden dort möglicherweise einen Translokationskanal (Krall *et al.*, 2002; Ward *et al.*, 2002a). Die kanalbildenden Eigenschaften werden VirB6 zugeschrieben, da es mehrere Transmembrandomänen besitzt und die Beteiligung von VirB6-Varianten an verschiedenen Stufen des Translokationsprozesses untermauern diese Hypothese (Jakubowski *et al.*, 2004; Judd *et al.*, 2005a and 2005b). Weiterhin bindet VirB8 an VirB10, das eine universell konservierte Komponente von Typ IV-Sekretionssystemen darstellt. (Das and Xie, 2000). Konformationelle Änderungen dieses Proteins im Translokationsprozess, abhängig von der Energieladung, zeigen, dass VirB10 die ATP-Hydrolyse der energetisierenden Komponenten mit der Translokation des Substrats koppelt (Cascales and Christie, 2004b). VirB10 ist in *A. tumefaciens* nicht direkt mit dem Substrat verbunden aber es ist essentiell für den Transfer des Substrats zu VirB9 und dem Pilin VirB2 (Cascales and Christie, 2004a). VirB9 könnte eine Sekretin-ähnliche Pore des Translokationskanals in der äußeren Membran bilden (Lawley, *et al.*, 2003). Es wird von VirB7, einem kleinen, 4,5 kDa großen Lipoprotein der äußeren

Membran, über eine kovalente Cystein-Brücke stabilisiert und diese Bindung verankert VirB9 an der äußeren Membran von *A. tumefaciens* (Anderson *et al.*, 1996; Baron *et al.*, 1997; Fernandez *et al.*, 1996a). VirB1 ist ein periplasmatisches VirB-Protein, das in vielen Typ IV-Sekretionssystemen konserviert ist, aber im Gegensatz zu den anderen Komponenten ist es oft nicht essentiell. Man geht davon aus, dass VirB1-ähnliche Proteine lokal die Mureinschicht auflösen, und so den Aufbau des membran-durchspannenden Komplexes erleichtern. Aufgereinigtes VirB1 von *B. suis* interagiert mit VirB8, VirB9 und VirB11 (Höppner *et al.*, 2005), was nahe legt, dass die Rekrutierung dieses Enzyms an die Stelle des Aufbaus des Sekretionssystems einen wichtigen Schritt für einen lokalen zielgerichteten Abbau des Mureins darstellt.

Die letzte Gruppe der T4SS-Komponenten besteht aus den pilus-assoziierten Proteinen VirB2, VirB5 und VirB3. VirB2 ist die Hauptkomponente des Pilus in *A. tumefaciens* und seine Homologen TrbC und TraA sind die Hauptkomponenten der entsprechenden RP4- und F-Pili (Eisenbrandt *et al.*, 1999; Lai and Kado, 1998). Die Rolle von VirB5-ähnlichen Proteinen ist noch nicht gesichert. Sie wurden als Nebenkomponten des Pilus in T4SS von *A. tumefaciens*, der Plasmide pKM101 und pJP4, entdeckt (Schmidt-Eisenlohr *et al.*, 1999a, 1999b and 2001). Die Kristallstruktur des VirB5-homologen Proteins TraC des Plasmids pKM101 wurde bestimmt und eine nachfolgende Struktur-Funktions-Analyse ergab eine mögliche Rolle als Adhäsion (Yeo *et al.*, 2003). VirB3 lokalisiert präferentiell in der äußeren Membran und seine Stabilisierung ist abhängig von VirB4 und VirB6. Diese Befunde deuten auf eine Funktion an der Zelloberfläche hin (Hapfelmeier *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 1994) und auf eine direkte Rolle im Aufbau des Pilus, beispielsweise VirB2 und VirB5 an die Stelle der Pilusentstehung zu dirigieren (Yuan *et al.*, 2005; Shamaei-Tousi *et al.*, 2004). Eine schematische Darstellung des oben beschriebenen VirB-Systems findet sich in untenstehender **Abb.I.2**.

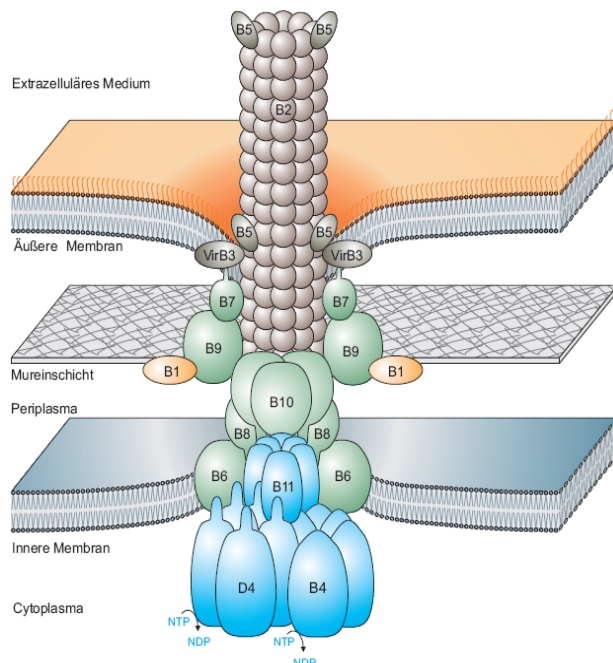


Abb.I.2: Schematische Darstellung des VirB-Typ IV-Sekretionssystems von *A. tumefaciens*. Der Apparat besteht aus zwölf verschiedenen Proteinen (VirB1-11 und VirD4) und durchspannt beide Membranen des Bakteriums. Die einzelnen Komponenten werden nach ihrer Funktion in die energieliefernden Komponenten VirB4, VirB11 und VirD4 (in blau dargestellt), die Kernkomplex- oder Apparatskomponenten VirB6-VirB10 (in grün), die Piluskomponenten VirB2, VirB5 und VirB3 (in grau), sowie die lytische Transglycosylase VirB1 (in gelb) eingeteilt. VirD4, das sogenannte Kopplungsprotein koppelt die Substrate an die strukturellen Komponenten und sorgt für deren Translokation. (aus Backert and Fischer, 2007)

Typ IV-Sekretionssysteme sind weit verbreitet unter pathogenen und symbiontischen Mikroorganismen und schließen sowohl extrazelluläre Erreger wie *A. tumefaciens* (Cascales and Christie, 2003; Christie *et al.*, 2005), *H. pylori* (Odenbreit *et al.*, 2000) oder *Bordetella pertussis* (Burns, 2003; Weiss *et al.*, 1993) als auch intrazelluläre Bakterien wie *Legionella pneumophila* (Sexton and Vogel, 2002) oder Spezies der Gattung *Bartonella* (Schulein *et al.*, 2005) mit ein. Die jeweiligen Systeme transportieren eine Vielzahl verschiedener Substrate wie Plasmide, Nukleoproteinkomplexe, Toxine oder Effektorproteine und die Anzahl der Effektoren schwankt zwischen nur einem bekannten, wie dem CagA-Protein von *H. pylori*, und über zwanzig wie beim Dot/Icm-System von *L. pneumophila* (Backert and Meyer, 2006). Beim bereits genauer beschriebenen VirB/VirD4-System von *A. tumefaciens* sind die Effektoren ein Nukleoproteinkomplex, bestehend aus der T-DNA und der Relaxase VirD2, sowie den Proteinen VirD5, VirE2, VirE3, VirE5 und VirF, die in die Pflanzenzelle transloziert werden (Schrammeijer *et al.*, 2003; Vergunst *et al.*, 2000; Ward *et al.*, 2002b; Backert and Fischer, 2007). Nach dem Transport wird die einzelsträngige DNA in den Zellkern transportiert und in das Genom integriert (Zupan *et al.*, 2000).

2.3 Das Cag-Typ IV-Sekretionssystem

Wie Sequenzanalysen der *cag*-PAI zeigten, kodiert dieser Genlocus ebenfalls für ein Typ IV-Sekretionssystem und weist starke Homologien zum *virB*-Operon des pflanzenpathogenen Bakteriums *Agrobacterium tumefaciens* auf (Akopyants *et al.*, 1998; Censini *et al.*, 1996). Die *cag*-Pathogenitätsinsel besteht aus 27 putativen Genen, von denen eines für das translozierte Substrat CagA kodiert. Unter den Komponenten des Cag-Sekretionssystems finden sich nur fünf mit signifikanten Homologien zum bereits erwähnten prototypischen VirB-System, nämlich CagE/HP544 zu VirB4, CagX/HP528 zu VirB9, CagY/HP527 zu VirB10, Cag α /HP525 zu VirB11 und Cag β /HP524 zu VirD4. In **Abb.I.3** ist schematisch die *cag*PAI des Stammes 26695 dargestellt. Die genannten Homologien sowie die beiden gebräuchlichsten Nomenklaturen sind angegeben (Censini *et al.*, 1996; Tomb *et al.*, 1997). Aus anschaulichen Gründen wird in dieser Arbeit die Nomenklatur von Censini *et al.*, 1996, verwendet.

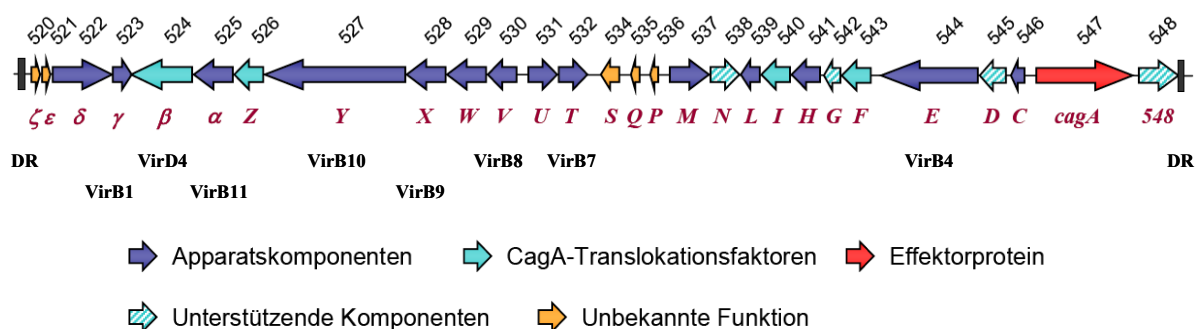


Abb I.3: schematische Darstellung der *cag*-Pathogenitätsinsel des Stammes 26695. Die Gene sind als Pfeile in der jeweiligen Orientierung des Leserahmens dargestellt und mit den durchlaufenden Nummern der Gensequenz nach Tomb *et al.*, 1997 bezeichnet. Unterhalb der zugehörigen Gene, in rot angegeben, findet sich die in dieser Arbeit verwendete Nomenklatur nach Censini *et al.*, 1996. Auch sind Homologien zu Komponenten des *virB*-Operons von *A. tumefaciens* in schwarz angezeigt. Die flankierenden direkten Sequenzwiederholungen (*direct repeats*, DR), die die Pathogenitätsinsel begrenzen, sind durch schwarze Kästchen dargestellt.

Für funktionelle Untersuchungen wurden alle Gene der *cag*-PAI einzeln durch Transposonmutagenese deletiert (Fischer *et al.*, 2001b) und ihr Einfluß auf die zwei bekannten Phänotypen charakterisiert, wodurch die Genprodukte der *cag*-Pathogenitätsinsel in drei funktionelle Klassen eingeteilt werden konnten (siehe **Abb.I.3**). In der ersten finden sich 14 essentielle Apparatskomponenten, die für beide Funktionen benötigt werden. In der zweiten Klasse sind vier Faktoren, die für die CagA-Translokation notwendig sind, aber keinen Einfluß auf die IL-8-Induktion haben. Diese werden auch als Translokationsfaktoren bezeichnet (Fischer *et al.*, 2001b). Die restliche Proteine, die hierfür keine Rolle spielen, also entweder unterstützende oder unbekannte Funktionen haben, finden sich in der letzten Klasse.

H. pylori ist bekannt für sein bemerkenswert hohes Maß an genetischer Diversität. Daten aus Typisierungsexperimenten deuten an, dass jedes Individuum seinen eigenen Stamm oder sogar mehrere Stämme zu tragen scheint. Diese Diversität resultiert einerseits aus einer ungewöhnlich hohen endogenen Mutationsrate (Wang *et al.*, 1999; Björkholm *et al.*, 2001), andererseits aus einer häufig stattfindenden Rekombination, die einen intensiven horizontalen Gentransfer benötigt (Suerbaum and Achtman, 1999). Dafür sind *H. pylori* Zellen natürlich kompetent und können exogene DNA mithilfe des ComB-Systems aufnehmen (Hofreuter *et al.*, 2001) und über homologe Rekombination in ihr Chromosom einbauen (Suerbaum *et al.*, 1998; Israel *et al.*, 2000). Weiterhin wird auch intragenomische Rekombination durch *slipped-strand-mispairing* beobachtet (Aras *et al.*, 2003b; Salaun *et al.*, 2004). Dementsprechend wird *H. pylori* als eines der genetisch diversesten Bakterien betrachtet (Suerbaum and Josenhans, 2007).

Auch die *cag*-Pathogenitätsinsel besitzt als genetisches Element einen dynamischen Charakter. Die flankierenden IS-Elemente können zu Neuordnungen der Sequenz und damit zu teilweisem oder vollständigem Verlust führen, wie bei einigen *H. pylori*-Stämmen gezeigt werden konnte (Censini *et al.*, 1996). Im Stamm NCTC11638 ist die Pathogenitätsinsel durch IS605 Insertionselemente in zwei Teile geteilt, die etwa 500 kb voneinander im Genom entfernt sind (Akopyants *et al.*, 1998), und andere Rearrangements können auch auftreten. So konnte bei einer Sequenzanalyse der kompletten *cag*-Pathogenitätsinsel von vier *H. pylori*-Isolaten eine Insertion beim Stamm Du52:2 im intergenischen Bereich zwischen *hp0546* und *hp0547* (*cagA*-Gen) festgestellt werden, die aus Rearrangements chromosomaler Bereiche bestand (Blomstergren *et al.*, 2004). Dabei war das 5'-Ende dieser Insertion ähnlich den Genen *hp510* und *hp509*, während das 3'-Ende nahe dem *cagA*-Gen das Gen *hp0511* enthielt. Eine ähnliche Anordnung findet sich auch im Stamm ATCC 43504. Hier wurde dieselbe Region beim Screen einer *H. pylori*-Genbank auf modulierende Faktoren der Urease entdeckt (McGee *et al.*, 1999). Man könnte daher vermuten, dass Rearrangements zwischen der *cag*-Pathogenitätsinsel und dem angrenzenden Genbereich häufiger vorkommen als vermutet und dass die Gene der inserierten Region möglicherweise eine Rolle bei der Funktion der Pathogenitätsinsel spielen. Das Gen *hp511* besitzt eine typische Lipoprotein-Signalsequenz (Tomb *et al.*, 1997) und könnte durch seine Lokalisierung auf der *cag*-PAI neben dem *cagA*-Gen für die bisher fehlende VirB7-Komponente kodieren. Außerdem wurde das Gen in dem oben genannten Screen als ein Urease verstärkender Faktor identifiziert (McGee *et al.*, 1999). Dies deutet auf eine Assoziation des Gens *hp511* mit Virulenzfaktoren in *H. pylori* hin.

Es ist nicht ungewöhnlich, dass Komponenten von Typ IV-Sekretionssystemen mit chromosomal kodierten Proteinen interagieren. Bei dem prototypischen VirB-Sekretionssystem von *Agrobacterium tumefaciens* konnten in biochemischen Assays Interaktionen zweier periplasmatischer Faktoren, AcvB und VirJ, mit den Komponenten

VirB1-VirB11, VirD4 sowie den Substraten VirE2 und VirD2 gezeigt werden. Den beiden Faktoren wird eine mögliche Chaperonfunktion im Periplasma zugeschrieben (Cascales and Christie, 2003).

In einem genomweiten *Yeast-Two-Hybrid*-Ansatz konnten zahlreiche Proteininteraktionen zwischen *cag*-PAI-Apparatskomponenten und chromosomal codierten Proteinen identifiziert werden (Rain *et al.*, 2001). Unter Anderem zeigten sich hier Interaktionen zwischen CagA und HP0496 und dem VirB11-homologen Protein CagA mit HP1451. Beide Interaktionen konnten ebenfalls biochemisch nachgewiesen werden (Terradot *et al.*, 2004). Ein zweites interagierendes Protein in diesem Screen mit CagA ist das Protein HP513. Damit rückt der Genbereich vor der *cag*-Pathogenitätsinsel (*hp520-hp547*) ins Interesse, nachdem sich dort zusätzlich zu den bereits angesprochenen Genen *hp496*, *hp511* und *hp513* noch einerseits Gene mit der Ähnlichkeit zum HslV/U-Proteasom (*hp515/hp516*) befinden, das zur Klasse von chaperon-ähnlichen ATPasen gehört, die mit dem Auf- und Abbau, sowie der Funktion von Proteinkomplexen assoziiert sind (Neuwald *et al.*, 1999; Groll *et al.*, 2005) und mit der Regulation von sekretierten Virulenzfaktoren verknüpft werden (Butler *et al.*, 2006). Andererseits findet sich direkt vor der *cag*-Pathogenitätsinsel das Gen *hp519*, das zur Gruppe der SLR-Proteine (*sel 1-like-repeats*) zählt, die als Adaptorproteine für den Aufbau membran-gebundener, makromolekularer Komplexe dienen (Mittl and Schneider-Brachert, 2007). Es wird diskutiert, ob SLR-Proteine, die eine hohe allelische Diversität aufweisen, für die Anpassung von *H. pylori* an verschiedene Wirte verantwortlich sind. Positiv-selektierte Bereiche auf der Oberfläche des Proteins könnten mit möglichen Wirtszellrezeptoren interagieren und so für das Management und Feintuning der Wirtsantwort während der chronischen Infektion selektiert werden (Ogura *et al.*, 2007). Daher ist es gerade im Falle von HP519 erstrebenswert, interagierende Wirtsproteine zu identifizieren und den Beitrag seiner Varianten auf diese Interaktionen und auf die Kolonisierung oder Virulenz zu identifizieren.

2.4 Translokationsmechanismus: Translokationssignal, Sekretionschaperone und Kopplungsproteine

Gerade bei Bakterien, die mehrere Typ IV-Sekretionssysteme besitzen, stellt sich die grundlegende Frage, wie die jeweiligen Substrate dem richtigen Apparat zur Translokation zugeführt werden. Hierbei spielt die Erkennung über Signalsequenzen in den Effektorproteinen eine wesentliche Rolle, allerdings kommen auch sehr unterschiedliche Erkennungsmechanismen zum Einsatz. Einige Effektorproteine, wie das Pertussistoxin von *Bordetella pertussis* (Burns *et al.*, 2004), werden durch N-terminale, Sec-abhängige Signalsequenzen zunächst ins Periplasma transportiert, um anschließend Typ IV-abhängig sekretiert zu werden. C-terminale Sekretionssignale finden sich hingegen bei Effektorproteinen in *Agrobacterium tumefaciens* (VirD2, VirD5, VirE2, VirE3 und VirF), sowie bei den Bep-Effektorproteinen des VirB-Systems in *Bartonella henselae* (Vergunst *et al.*, 2005; Schulein *et al.*, 2005). Im Dot/Icm-System von *L. pneumophila* gibt es sowohl Substrate mit N-terminaler (DotA) als auch mit C-terminaler Signalsequenz (RalF). Sec-abhängige und C-terminale Signalsequenzen könnten also durchaus alternative Wege sein, um Zugang zum periplasmatischen Raum und anschließend zum T4SS zu erlangen.

CagA ist bislang das erste Typ IV-Effektorprotein, das neben dem in T4SS vorkommenden C-terminalen Translokationssignal zusätzlich den N-terminalen Proteinbereich zur Sekretion benötigt (Hohlfeld *et al.*, 2006). Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass CagA nicht über ein lineares, sondern ein konformationelles Signal verfügt. Die C-terminale Hälfte scheint

allerdings ausreichend zu sein, um CagA zum Sekretionsapparat zu rekrutieren (Hohlfeld *et al.*, 2006).

Die Sekretionssignale werden zum einen durch Sekretions-Chaperone erkannt, die Stabilität und Sekretionskompetenz der zugehörigen Effektorproteine vermitteln bzw. aufrechterhalten. Sekretions-Chaperone wurden vor allem in Typ III-Systemen umfassend charakterisiert (Akeda and Galan, 2005; Feldman and Cornelis, 2003). Hier ist in einigen Fällen die Translokation jedoch nicht zwingend abhängig von der Anwesenheit von Chaperonen, es wird durch sie eine Hierarchie in der Sekretionsreihenfolge der Effektoren bedingt (Boyd *et al.*, 2000; Wulff-Strobel *et al.*, 2002). In Typ IV-Sekretionssystemen wurden Sekretions-Chaperone bisher für das VirB/D4- System in *A. tumefaciens* und das Dot/Icm-System in *L. pneumophila* beschrieben. So wurde gezeigt, dass die Translokation des Effektorproteins VirE2 von *A. tumefaciens* in Pflanzenzellen von dem Chaperonprotein VirE1 abhängt (Deng *et al.*, 1999; Sundberg *et al.*, 1996; Sundberg and Ream, 1999). In *L. pneumophila* sind die Proteine IcmS, IcmW und LvgA für die Translokation einiger Substrate in das Cytosol der Wirtszelle notwendig, und werden als Typ IV-Adaptoren bezeichnet. Eine Chaperon-ähnliche Funktion ist hier sehr wahrscheinlich (Vincent and Vogel, 2006).

Zum anderen binden sogenannte Kopplungsproteine die jeweiligen Substrate und führen sie dem Sekretionsapparat zu. Hierzu gehören u. a. die Proteine TraG und TrwB der konjugativen Plasmide RP4 bzw. R388 sowie das VirD4-Protein in *A. tumefaciens* (Cascales and Christie, 2003; Christie *et al.*, 2005; Gomis-Ruth *et al.*, 2002; Llosa *et al.*, 2002). In *A. tumefaciens* interagiert das Kopplungsprotein VirD4 mit dem translozierten Substrat VirE2 (Atmakuri *et al.*, 2003). Interessanterweise ist für den Transport des Pertussistoxins aus *B. pertussis*, welches keine C-terminale Signalsequenz enthält, auch kein Kopplungsprotein notwendig. Die Abwesenheit eines VirD4-homologen Proteins in *Bordetella* lässt vermuten, dass das ursprüngliche Kopplungsprotein dieses Systems im Laufe der Evolution durch das Sec-System ersetzt wurde.

Unter den Translokationsfaktoren im Cag-System von *H. pylori*, die für die CagA-Translokation notwendig sind, nicht aber für den Apparatsaufbau, konnte bereits das CagF-Protein (HP543) als Sekretionschaperon für das CagA-Protein identifiziert werden (Couturier *et al.*, 2006; Pattis *et al.*, 2007). Dem VirD4-homologen Protein Cagß (HP524) wird eine Funktion als Kopplungsprotein zugeschrieben (Fischer *et al.*, 2001b).

Für die Translokationsroute im Prozess der Typ IV-Sekretion können zwei vorläufige Arbeitsmodelle aufgestellt werden (Cascales and Christie, 2003). Nach dem Kanalmodell rekrutiert und liefert das Kopplungsprotein die DNA- bzw. Proteinsubstrate an einen membrann-durchspannenden Kanalkomplex, bestehend aus VirB1-11. Die Substrate könnten nun in den Kanal an der zytoplasmatischen Seite der inneren Membran eintreten. Sie werden dann durch das Lumen einer Pilus-ähnlichen Struktur, die sich über die Zellhülle hinaus erstreckt, befördert. Alternativ hierzu ist das Kolbenmodell dynamischer, nachdem die Substrate hier erst über das Kopplungsprotein ins Periplasma transportiert und dann auf die Spitze einer Pilus-ähnlichen Struktur geliefert werden. Durch einen kolben-ähnlichen Mechanismus dehnt sich der rudimentäre Pilus aus und drückt die Substrate über die äußere Membran. Für den weiteren Export von Substraten zieht sich der Pilus für einen zweiten Translokationszyklus wieder zurück. Die Rolle des Kopplungsproteins besteht bei beiden Modellen in der Funktion eines Rekrutierungsfaktors oder einer Translokase über die innere Membran ins Periplasma.

2.5. Interaktionen des Cag-Systems mit Integrinen als Rezeptoren auf der Wirtszelloberfläche

Integrine sind Glykoproteine der Zelloberfläche, die Interaktionen zwischen Zellen und von Zellen mit der extrazellulären Matrix (ECM) vermitteln. Als heterodimere Rezeptoren werden sie durch die nicht-kovalente Assoziierung von α - und β -Untereinheiten gebildet. Beide enthalten eine große extrazelluläre Domäne, einen einzelnen Transmembranabschnitt und, mit Ausnahme der Untereinheit β_4 , einen kurzen zytoplasmatischen Schwanz. Im Menschen gibt es 19 unterschiedliche α -Untereinheiten und 8 β -Untereinheiten, die zu 25 verschiedenen Rezeptoren kombiniert werden (Hynes, 2002). Die Interaktion mit dem Liganden kann von einer kurzen Erkennungssequenz im Liganden abhängen, wie beispielsweise dem RGD-Motif (Arg-Gly-Asp) im ECM-Protein Fibronectin, das durch das Integrin $\alpha_5\beta_1$ erkannt wird, oder aber es wird die gesamte Konformation des Liganden erkannt (Giancotti and Ruoslahti, 1999). Integrine hämatopoetischer Zellen binden auch Gegenrezeptoren auf anderen Zellen wie die interzellulären Adhäsionsmoleküle (ICAMs) und das „vaskuläre Zell-Adhäsions-Molekül 1“ (VCAM-1) (van der Flier and Sonnenberg, 2001). In adhären Zellen konzentrieren sich die Integrine an fokale Adhäsionen. An diesen Stellen verankern die Integrine nicht nur die Zellen an die extrazelluläre Matrix, sondern integrieren die Anheftung der Zellaußenseite mit der Organisation des Zellzytoskeletts (daher der Name „Integrine“). Integrin-Komplexe übermitteln sowohl Signale in das Zellinnere (*outside-in signalling* genannt) als auch Signale aus dem Zellinneren (*inside-out-signalling* genannt) (Brunton *et al.*, 2004; Hynes, 2002). Deshalb assoziieren die Integrine an diesen fokalen Adhäsionen mit zellulären Signalmolekülen wie den Proteintyrosinkinasen FAK oder Src (Parsons *et al.*, 2000).

Die Oberflächenexposition der Integrine, ihre Signalkapazität und ihre Konserviertheit machen sie zu idealen Zielen für Pathogene, um sich selbst an Wirtszellen zu verankern, oder mit ihnen zu kommunizieren. Es gibt zahlreiche Beispiele von Mikroorganismen, die Rezeptoren zur Zelladhäsion erkennen und deren Funktion für ihre eigenen Zwecke ausnutzen (Hauck, 2002; Boyle and Finlay, 2003; Scibelli *et al.*, 2007). Einmal interagieren dabei bakterielle Proteine direkt mit Untereinheiten des Integrins. Als Beispiel hierfür wäre das Invasin von *Yersinia pseudotuberculosis* und *Yersinia enterocolitica* zu nennen, das als Ligand für β_1 -Integrine exprimiert wird und den Bakterien erlaubt, nicht nur an β_1 -Integrin exprimierende Zellen zu binden, sondern auch in sie einzudringen (Isberg *et al.*, 1987). Zum anderen wird über die Bindung an einen natürlichen Liganden der extrazellulären Matrix die Integrinfunktion ausgenutzt. Dies ist der Fall bei den Opa-Proteinen (*opacity associated*) von *Neisseria*, einer Familie von phasen-variablen Proteinen, die als Adhäsine agieren und die Invasion erleichtern (Dehio *et al.*, 1998b). Diese Proteine binden die ECM-Proteine Vitronectin und Fibronectin und benutzen diese Moleküle als Brückenliganden, um über verschiedene Integrin-Heterodimere die Aufnahme in Epithelzellen zu induzieren (Dehio *et al.*, 1998a, Gomez-Duarte *et al.*, 1997).

Integrine spielen auch in der Pathogenese von *H. pylori* eine wichtige Rolle. Für die beiden Hauptvirulenzfaktoren, das vakuolisierende Zytotoxin A, VacA, und den Cag-Typ IV-Sekretionsapparat, konnten kürzlich Rezeptoren auf der Wirtszelloberfläche identifiziert werden. Dabei vermittelt das β_2 -Integrin die Aufnahme von VacA in humane T-Zellen (Sewald *et al.*, 2008), während das $\alpha_5\beta_1$ -Heterodimer als Rezeptor für den Cag-Typ IV-Sekretionsapparat fungiert (Kwok *et al.*, 2007). Über Wechselwirkungen des Typ IV-Apparats mit möglichen Rezeptoren ist bisher noch wenig bekannt und sowohl Mechanismus als auch strukturelle Basis für die Typ IV-vermittelte Proteinsekretion sind nicht gut verstanden. Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen konnten pilus-ähnliche Filamente an der Oberfläche von *H. pylori*-Zellen beobachtet werden (Rohde *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2003). Bei dem kürzlich identifizierten β_1 -Integrin als Rezeptor für den Sekretionsapparat scheint ein Protein der *cag*-Pathogenitätsinsel eine wichtige Rolle zu spielen, nämlich das CagL-Protein. Es soll die CagA-Translokation als molekulare Verbindung zwischen dem Sekretionsapparat und den Wirtszell-Integrinen vermitteln. CagL wird auf den Typ IV-Sekretionspili exprimiert und enthält auch ein RGD-Sequenzmotif, das in Proteinen der extrazellulären Matrix wie Fibronectin und Vitronectin zu finden ist, die Integrine binden und aktivieren (Xiong *et al.*, 2002). So soll abhängig von diesem RGD-Motif die Bindung des Apparats an die Integrine durch CagL als spezialisiertes Adhäsion hergestellt werden (Kwok *et al.*, 2007).

3. Ziele der Arbeit

Die *cag*-Pathogenitätsinsel mit dem darauf kodierten Cag-Typ IV-Sekretionsapparat und dem Effektorprotein CagA stellt einen der Hauptvirulenzfaktoren in der Pathogenese von *H. pylori* dar. Zwar konnten bereits einzelne Komponenten des Apparats durch Sequenzhomologien zu anderen Typ IV-Sekretionssystemen wie dem prototypischen VirB-System von *A. tumefaciens* identifiziert werden und auch eine erste funktionelle Analyse der Effekte einzelner Komponenten auf die Translokation von CagA und die Induktion einer IL-8 Immunantwort in Epithelzellen identifizierte essentielle und akzessorische Apparatskomponenten, sowie verschiedene Translokationsfaktoren. Allerdings ist über die Beteiligung chromosomaler Faktoren, wie sie auch in anderen Typ IV-Systemen zu beobachten ist, sowie über den strukturellen Aufbau des Apparats, noch wenig bekannt. Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit zunächst der Genbereich vor der *cag*-Pathogenitätsinsel, *hp496-hp519*, der durch interessante virulenzassoziierte Eigenschaften auffällt, näher untersucht werden. Durch die Herstellung von Mutanten in den jeweiligen Genen sollten mögliche Effekte auf den Apparat und die CagA-Funktionen in verschiedenen Assays nachgewiesen werden. Danach sollten umfassende Wechselwirkungen zwischen Apparatskomponenten, Translokationsfaktoren und dem CagA-Protein identifiziert werden und zusammen mit Untersuchungen zur zellulären Lokalisierung und gegenseitigen Stabilisierung essentieller Komponenten und einer näheren Charakterisierung gefundener Protein-Interaktionen zu einem ersten strukturellen Modell des Cag-Typ IV-Sekretionssystems führen.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit beinhaltete Untersuchungen zum Translokationsmechanismus von CagA. Die gewonnenen Ergebnisse der Protein-Interaktionsstudien sollten zur Ermittlung einer Translokationsroute des Effektorproteins durch den Apparat herangezogen werden. Bisher ist nämlich in allen Typ IV-Translokationssystemen unklar, ob eine Zwischenstufe der Effektoren im Periplasma auftritt, oder ob ein einstufiger Transport über beide Membranen hinweg erfolgt.

Nachdem kürzlich das β_1 -Integrin als Rezeptor für den Cag-Sekretionsapparat identifiziert wurde und ein weiteres Protein der *cag*-Pathogenitätsinsel, das CagL-Protein, als mögliches Adhäsion an der Bindung maßgeblich beteiligt sein soll (Kwok *et al.*, 2007), sollten zudem weitere mögliche Interaktionen zwischen Proteinen der *cag*-PAI und dem β_1 -Integrin gefunden werden.

II Material und Methoden

1. Material

1.1 Zelllinien

| | |
|---------|---|
| AGS | humane Magenadenokarzinom-Zelllinie (ATCC CRL-1739) |
| J774A.1 | murine Makrophagen-Zelllinie (ATCC TIB-67) |

1.2 Bakterien- und Hefestämme

Im Folgenden sind alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterien- und Hefestämme mit den jeweiligen relevanten Eigenschaften aufgelistet.

Escherichia coli-Stämme:

| Stamm | Eigenschaften/Genotyp |
|-------------|--|
| DH5α (E142) | F- ϕ 80lacZΔM15Δ(lacZYA-argF) U169 deoR recA 1 endA 1 hsdR 17 (rK- mK+) supE 44 thi -1 λ-gyrA 96 relA 1 (Gibco /Invitrogen) |
| TOP10 | F- ϕ 80lacZΔM15Δ(lacZYA-argF) U169 deoR recA 1 araD 139Δ(ara-leu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA 1 nupG (Invitrogen) |
| BL21(DE3) | F- ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm (DE3) (Novagen) |
| HB101 | F-, lacY1, recA13, hsdS20(r _B ⁻ , m _B ⁻), supE44, λ ⁻ , thi-1, ara-14, proA2, leuB, galK2, rpsL20, xyl-5, mtl-1 (Boyer <i>et al.</i> , 1969) |
| E181 | HB101, F-, lacY1, recA13, hsdS20(r _B ⁻ , m _B ⁻), supE44, λ ⁻ , thi-1, ara-14, proA2, leuB, galK2, rpsL20, xyl-5, mtl-1, λ-CH616 (S. Odenbreit, W. Fischer) |
| E132 | HB101, F-, lacY1, recA13, hsdS20(r _B ⁻ , m _B ⁻), supE44, λ ⁻ , thi-1, ara-14, proA2, leuB, galK2, rpsL20, xyl-5, mtl-1, pRK2013 (Ditta <i>et al.</i> , 1980) |
| E33 | DH5α, polA1, Rif ^R (auf spontane Rifampicin-Resistenz selektioniert) |

Helicobacter pylori-Stämme:

| Stamm | Eigenschaften/Genotyp |
|----------|--|
| P12 | Klinisches Isolat (888-0) der Abteilung „Medizinische Mikrobiologie und Immunologie“ der Universität Hamburg (Schmitt and Haas, 1994). |
| 26695 | komplett Genom-sequenzierter Stamm (Tomb <i>et al.</i> , 1997). |
| P12Δcagδ | P12cagδ ⁻ , Cam ^R (W. Fischer) |
| P12Δcagγ | P12cagγ ⁻ , Cam ^R (W. Fischer) |
| P12Δcaga | P12caga ⁻ , Cam ^R (W. Fischer) |
| P12ΔcagY | P12cagY ⁻ , Cam ^R (W. Fischer) |
| P12ΔcagX | P12cagX ⁻ , Cam ^R (W. Fischer) |
| P12ΔcagW | P12cagW ⁻ , Cam ^R (W. Fischer) |
| P12ΔcagV | P12cagV ⁻ , Cam ^R (W. Fischer) |
| P12ΔcagU | P12cagU ⁻ , Cam ^R (W. Fischer) |
| P12ΔcagT | P12cagT ⁻ , Cam ^R (W. Fischer) |
| P12ΔcagM | P12cagM ⁻ , Cam ^R (W. Fischer) |
| P12ΔcagL | P12cagL ⁻ , Cam ^R (W. Fischer) |

Helicobacter pylori-Stämme (Fortsetzung):

| Stamm | Eigenschaften/Genotyp |
|-----------------------------|--|
| P12 Δ cagH | P12cagH, Cam ^R (W. Fischer) |
| P12 Δ cagE | P12cagE ⁻ , Cam ^R (W. Fischer) |
| P12 Δ cagC | P12cagC ⁻ , Cam ^R (W. Fischer) |
| P12 Δ cagA | P12cagA ⁻ , Cam ^R (W. Fischer) |
| P12 Δ PAI | P12PAI ⁻ , Deletion der cagPAI, Cam ^R (W. Fischer, Odenbreit <i>et al.</i> , 2001) |
| 26695 Δ cag δ | 26695cag δ ⁻ , Cam ^R (Fischer <i>et al.</i> , 2001b) |
| 26695 Δ cag γ | 26695cag γ ⁻ , Cam ^R (Fischer <i>et al.</i> , 2001b) |
| 26695 Δ cag α | 26695cag α ⁻ , Cam ^R (Fischer <i>et al.</i> , 2001b) |
| 26695 Δ cagY | 26695cagY ⁻ , Cam ^R (Fischer <i>et al.</i> , 2001b) |
| 26695 Δ cagX | 26695cagX ⁻ , Cam ^R (Fischer <i>et al.</i> , 2001b) |
| 26695 Δ cagW | 26695cagW ⁻ , Cam ^R (Fischer <i>et al.</i> , 2001b) |
| 26695 Δ cagV | 26695cagV ⁻ , Cam ^R (Fischer <i>et al.</i> , 2001b) |
| 26695 Δ cagU | 26695cagU ⁻ , Cam ^R (Fischer <i>et al.</i> , 2001b) |
| 26695 Δ cagT | 26695cagT ⁻ , Cam ^R (Fischer <i>et al.</i> , 2001b) |
| 26695 Δ cagM | 26695cagM ⁻ , Cam ^R (Fischer <i>et al.</i> , 2001b) |
| 26695 Δ cagL | 26695cagL ⁻ , Cam ^R (Fischer <i>et al.</i> , 2001b) |
| 26695 Δ cagH | 26695cagH ⁻ , Cam ^R (Fischer <i>et al.</i> , 2001b) |
| 26695 Δ cagE | 26695cagE ⁻ , Cam ^R (Fischer <i>et al.</i> , 2001b) |
| 26695 Δ cagC | 26695cagC ⁻ , Cam ^R (Fischer <i>et al.</i> , 2001b) |
| 26695 Δ cagA | 26695cagA ⁻ , Cam ^R (Fischer <i>et al.</i> , 2001b) |

Saccharomyces cerevisiae-Stämme

| | |
|-------|---|
| AH109 | Ade ⁻ , Trp ⁻ , Leu ⁻ , His ⁻ , haploid, Mating Typ a (Uetz <i>et al.</i> , 2006) |
| Y187 | Ade ⁻ , Met ⁻ , Trp ⁻ , Leu ⁻ , His ⁻ , haploid, Mating Typ α (Uetz <i>et al.</i> , 2006) |

1.3 Plasmide

| | |
|---|--|
| pBluescript II KS ⁺ /SK ⁺ | <i>ori</i> _{colE1} , <i>ori</i> _{fl(+)} , <i>lacZ</i> , M13 forward- und reverse-Primer-Bindungsstellen, Amp ^R (Stratagene) |
| pMin2 | <i>ori</i> _{colE1} , <i>oriT</i> , P _{iga} , Tet ^R (Kahrs <i>et al.</i> , 1995) |
| pSK3 | pBluescript, Cam ^R , V511 über WS274/WS275, N511 über WS 276/WS277 |
| pSK4 | pMin2, hp0515-hp0519 über WS 282/JP23 |
| pSK5 | pMin2, hp0512-hp0517 über WS280/WS283 |
| pSK6 | 2kb-08-K24 |
| pTnMax5 | <i>ori</i> _{fd} , P _{trc} , <i>tnpA</i> , <i>tnpR</i> , <i>lacIq</i> , IR, <i>res</i> , <i>cat</i> _{GC} , M13 forward- und reverse-Primerbindungsstellen, Cam ^R (Kahrs <i>et al.</i> , 1995) |
| pDONR TM 207 | <i>ori</i> _{PUC} , attP1/attP2, <i>ccdB</i> , Gen ^R (Invitrogen) |
| pGADT7 | <i>ori</i> _{2μ} , <i>ori</i> _{PUC} , P _{ADH1} , P _{T7} , SV40 NLS, GAL4 AD, T _{ADH1} , LEU2, Amp ^R (Clontech) |
| pGBKT7 | <i>ori</i> _{2μ} , <i>ori</i> _{PUC} , <i>ori</i> _{fl} , P _{ADH1} , P _{T7} , GAL4 DNA-BD, T _{ADH1&T7} , TRP1, Kan ^R (Clontech) |

1.4 Oligonukleotide

Tabelle II.1: in der Arbeit verwendete Oligonukleotide

| Name | Sequenz (5'→3') | Gen |
|-------|---|-------------|
| attB1 | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT | ext for |
| attB2 | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT | ext rev |
| RB42 | AAAAAGCAGGCTCCGCCATGGCTGACACAATCAATACA ACTGA | <i>cagζ</i> |
| RB43 | AGAAAGCTGGGTCTAATCTTTAGTCTCTTTGGCTTCAGT | <i>cagζ</i> |
| RB44 | AAAAAGCAGGCTCCGCCATGATACAAAGAGGATTGAGT AGTGTCT | <i>cagε</i> |
| RB45 | AGAAAGCTGGGTCTAATCCATTGCATTTGGGATATTTAG G | <i>cagε</i> |
| RB46 | AAAAAGCAGGCTCCGCCATGAAAGAAATAAGTGAAGCC GATAAGG | <i>cagδ</i> |
| RB47 | AGAAAGCTGGGTCTACTTTGAATCTTTCAGTAACGCTTTT TG | <i>cagδ</i> |
| RB48 | AAAAAGCAGGCTCCGCCATGTTCGAGAAATGGATTGGTC TGA | <i>cagγ</i> |
| RB49 | AGAAAGCTGGGTCTACTCGTTATATCGCACTTGAGAATA AAT | <i>cagγ</i> |
| RB50 | AAAAAGCAGGCTCCGCCATGCTCTTAGGTAATTTTTATG ATGATAATCGATCG | <i>cagβ</i> |
| RB51 | AGAAAGCTGGGTCTAGACTAAGGATATATTGAACCCATA AATCTT | <i>cagβ</i> |
| RB52 | AAAAAGCAGGCTCCGCCATGTGGTTCTTAAAATACTTAA CTCGGAC | <i>cagβ</i> |
| RB53 | AGAAAGCTGGGTCTACAGTTCAGTTGAACCCACAG | <i>cagβ</i> |
| RB54 | AAAAAGCAGGCTCCGCCATGACTGAAGACAGATTGAGT GCA | <i>cagα</i> |
| RB55 | AGAAAGCTGGGTCTACCTGTGTTTGATATAAAATTCATC ACAC | <i>cagα</i> |
| RB56 | AAAAAGCAGGCTCCGCCATGGAACCTCGGTTTCAATGAA GCA | <i>cagZ</i> |
| RB57 | AGAAAGCTGGGTCTATTCCAAATTTAATTTTAATTGGGT TATCAATTTAG | <i>cagZ</i> |
| RB58 | AAAAAGCAGGCTCCGCCATGAATGAAGAAAACGATAAA CTTGAAACTT | <i>cagY</i> |
| RB59 | AGAAAGCTGGGTCTAAATAATATATTTCTTTTGGCTTCCT TTGATAAT | <i>cagY</i> |
| RB60 | AAAAAGCAGGCTCCGCCATGATTTTTCCTACTTCATGC CTTTG | <i>cagY</i> |
| RB61 | AGAAAGCTGGGTCTAGCCTATGCGCTTCATAAAGTG | <i>cagY</i> |
| RB63 | AAAAAGCAGGCTCCGCCATGATCATAGCTCTAGATAAAC TCATAGGC | <i>cagY</i> |
| RB64 | AGAAAGCTGGGTCTAATTGCCACCTTTGGGGCT | <i>cagY</i> |
| RB65 | AAAAAGCAGGCTCCGCCATGAATTTTAATCGTGGTAGGG TGAAAG | <i>cagX</i> |
| RB66 | AGAAAGCTGGGTCTATTTATCTCTGACAACAGGGAGC | <i>cagX</i> |

| Name | Sequenz (5'→3') | Gen |
|------|--|-------------|
| RB67 | AAAAAGCAGGCTCCGCCATGGATTTGCCCATTTGTTTCAA ATCTC | <i>cagW</i> |
| RB68 | AGAAAGCTGGGTCTATCCTTTAAACATAGATCCACCAAC T | <i>cagW</i> |
| RB69 | AAAAAGCAGGCTCCGCCATGTTGAAGAAAACGGATATA TTTGTTTATGG | <i>cagV</i> |
| RB70 | AGAAAGCTGGGTCTATTTATTTAATGCCTTATTTTTTGAT TCCACTT | <i>cagV</i> |
| RB71 | AAAAAGCAGGCTCCGCCATGATGAACGATACAACAGAG CATC | <i>cagU</i> |
| RB72 | AGAAAGCTGGGTCTATTCTGCACCGCCTTGTTT | <i>cagU</i> |
| RB73 | AAAAAGCAGGCTCCGCCATGAATTATGCGAAAAAAGTG GTGAAAC | <i>cagT</i> |
| RB74 | AGAAAGCTGGGTCTACTTACCACTGAGCAAACCTTCTG | <i>cagT</i> |
| RB75 | AAAAAGCAGGCTCCGCCATGATGAGTAATAACATGCGA AAACTCTTC | <i>cagS</i> |
| RB76 | AGAAAGCTGGGTCTACACTCCTTTTTCTTTCATGTATTTT TCAA | <i>cagS</i> |
| RB77 | AAAAAGCAGGCTCCGCCATGCTTCCTACTAAAACACGC | <i>cagQ</i> |
| RB78 | AGAAAGCTGGGTCTAGAGTCTTACTTGAGAGACACTCAT T | <i>cagQ</i> |
| RB79 | AAAAAGCAGGCTCCGCCATGAAACGACCGATTAGCAAG T | <i>cagP</i> |
| RB80 | AGAAAGCTGGGTCTATAAGAACCAATTTTGCCATTGAGT | <i>cagP</i> |
| RB81 | AAAAAGCAGGCTCCGCCATGGCTAATCTGGAGCAGTTTG GT | <i>cagM</i> |
| RB82 | AGAAAGCTGGGTCTATTCAAAGGGATTATTCTTGGCAA | <i>cagM</i> |
| RB83 | AAAAAGCAGGCTCCGCCATGAATACAGCATTATTGCCGA GTG | <i>cagN</i> |
| RB84 | AGAAAGCTGGGTCTATTTTTTCCCATGAGCGATGC | <i>cagN</i> |
| RB85 | AAAAAGCAGGCTCCGCCATGGATATAACAAGCGGTTTA AAGCAAC | <i>cagL</i> |
| RB86 | AGAAAGCTGGGTCTATTTAACAATGATCTTACTTGATTG CCT | <i>cagL</i> |
| RB87 | AAAAAGCAGGCTCCGCCATGATAACGCTTGAACCCGCC | <i>cagI</i> |
| RB88 | AGAAAGCTGGGTCTATTTGACAATAACTTTAGAGCTAGC AAT | <i>cagI</i> |
| RB89 | AAAAAGCAGGCTCCGCCATGAATCCGCAAATGACCGCT | <i>cagH</i> |
| RB90 | AGAAAGCTGGGTCTACTTCACGATTATTTTAGTTTGCAC C | <i>cagH</i> |
| RB91 | AAAAAGCAGGCTCCGCCATGCAAAACACGGATATAAAA GATATTAGTCCT | <i>cagG</i> |
| RB92 | AGAAAGCTGGGTCTAATACCCTAAGATCGGTGGTAAAA AT | <i>cagG</i> |
| RB93 | AAAAAGCAGGCTCCGCCATGAAACAAAGTTTGCGCGAA | <i>cagF</i> |
| RB94 | AGAAAGCTGGGTCTAATCGTTACTTTTGTTTTGATTTTTT TGATC | <i>cagF</i> |
| RB95 | AAAAAGCAGGCTCCGCCATGCCTGTTTTGATTGTAGCGA TTGTTA | <i>cagE</i> |

| Name | Sequenz (5'→3') | Gen |
|----------|--|------------------|
| RB96 | AGAAAGCTGGGTCTAATACTCCTTTATTTGTTGATACATT TGTTG | <i>cagE</i> |
| RB97 | AAAAAGCAGGCTCCGCCATGGACGATAAAGAAGCCAAA AAAGAAG | <i>cagD</i> |
| RB98 | AGAAAGCTGGGTCTATAGATATACCGCTTCACATGTAAT CG | <i>cagD</i> |
| RB99 | AAAAAGCAGGCTCCGCCATGAAATTTTTTACAAGAATCA CTGACAG | <i>cagC</i> |
| RB100 | AGAAAGCTGGGTCTAGCTAGCTCCTCCGCTCT | <i>cagC</i> |
| RB101 | AAAAAGCAGGCTCCGCCATGACTAACGAACTATTGATC AAACA | <i>cagA</i> |
| RB102 | AGAAAGCTGGGTCTAAGATTTTTTGGAACACCTTTTGT A | <i>cagA</i> |
| RB103 | AGAAAGCTGGGTCTACACCTCGTCATAGTTGCCTGTGCT TTT | <i>cagA</i> |
| RB104neu | AAAAAGCAGGCTCCGCCCTAACCGCTAAAGGATTGTCCC TA | <i>cagA</i> |
| LJ24 | AAAAAGCAGGCTCCGCCAATGAATTTACAACCAATTTTC | <i>Itgb1*</i> |
| LJ25 | AGAAAGCTGGGTCTAGATGTCTGGACCAGTGGG | <i>Itgb1*</i> |
| WS274 | ACCGCTCGAGGCTATTTCTAATGGTTTTTCAT | <i>hp0511</i> |
| WS275 | GCGGTACCGAGATGTTTGGTTGAATG | <i>hp0510</i> |
| WS276 | CGGGATCCGGCACTAGGTTTTAGTTGG | <i>hp0511</i> |
| WS277 | GCTCTAGATTGATCCCGGCGAGG | <i>hp0512</i> |
| WS280 | ACCGCTCGAGTATGGGGCAAAAAAAGTAG | <i>hp0512</i> |
| WS282 | CGGGATCCTCGAGAAAATTTTGAGCTTTAATG | <i>hp0515</i> |
| WS283 | CGAGATCTGTGACTTAGTTTTTCATCATATAAAAT | <i>hp0517</i> |
| WS330 | GAGGATCCAA ATTGTTTAAG GAGCTG | <i>hp0496</i> |
| WS331 | ACCGCTCGAG CCTACAGCGC ATTAATTC | <i>hp0496</i> |
| JP22 | GGGGTACCTTACCGGCTTTATTAATG | <i>hp0519</i> |
| JP23 | GAAGATCTAAGGATCTGACATGTTTA | <i>hp0519</i> |
| RH136 | ATAAGAATGCGGCCGCTAAATGACTAAGGAAGCTAA | <i>catGC</i> |
| RH137 | ATAAGAATGCGGCCGCTTACGCCCCGCCCTGCCAC | <i>catGC</i> |
| HH48 | AGCAGATCTATTCAGGTTTCATCATGCCGTC | <i>catGC (E)</i> |
| SK1 | ACCCATCCTAAAATAGTGCC | <i>hp0496</i> |
| SK2 | TTAGGGATAAACAAGGGCG | <i>hp0496</i> |

* Itgb1 = humanes Integrin β_1 , extrazelluläre Domäne, AS 1-728

1.5 Antikörper

Primäre Antikörper:

| | |
|--------------------------|---|
| α - AlpB (AK262) | Polyklonales Antiserum gegen ein AlpB-Fusionsprotein (HP1243) von <i>H. pylori</i> 26695 (Kaninchen) (Odenbreit <i>et al.</i> 2002) |
| α - Cag α | Polyklonales Antiserum gegen das Protein HP525 von <i>H. pylori</i> (Kaninchen) (Krause <i>et al.</i> , 2000) |
| α - CagA (AK257) | Polyklonales Antiserum gegen die C-terminale Hälfte des CagA-Proteins von <i>H. pylori</i> 185-44 (Kaninchen) (Odenbreit <i>et al.</i> , 2001) |
| α - CagA (AK268) | Polyklonales Antiserum gegen die N-terminale Hälfte des CagA-Proteins von <i>H. pylori</i> 185-44 (Kaninchen) (W. Fischer) |
| α - CagC | Polyklonale Antisera gegen synthetische Peptide des Proteins HP546 von <i>H. pylori</i> 26695 (anti-CagC ₁ : aa 66-79, anti CagC ₂ : aa 106-115) (Kaninchen) (Eurogentec) |
| α - CagY (AK273) | Polyklonales Antiserum gegen das Protein HP527 (aa 351-1311) von <i>H. pylori</i> J99 (Kaninchen) (Rohde <i>et al.</i> 2003) |
| α - CagX | Polyklonales Antiserum gegen das Protein HP528 (aa 37-522) von <i>H. pylori</i> J99 (Kaninchen) (Kutter <i>et al.</i> , 2008) |
| α - CagT (AK270) | Polyklonales Antiserum gegen das Protein HP532 (aa 25-280) von <i>H. pylori</i> J99 (Kaninchen) (Rohde <i>et al.</i> 2003) |
| α - CagL (AK271) | Polyklonales Antiserum gegen das Protein HP539 (aa 21-237) von <i>H. pylori</i> J99 (Kaninchen) (Kutter <i>et al.</i> , 2008) |
| α - CagM | Polyklonales Antiserum gegen das Protein HP537 von <i>H. pylori</i> 26695 (Kaninchen), zur Verfügung gestellt von Wulf Schneider-Brachert, Regensburg, (Kutter <i>et al.</i> , 2008) |
| α -ComB10 (AK252) | Polyklonales Antiserum gegen ein <i>H. pylori</i> P1 ComB10-Fusionsprotein (Kaninchen) (D. Hofreuter) |
| α - HA (HA-7) | Monoklonaler Antikörper gegen das HA-Epitop YPYDVDPYA (Maus), (Sigma) |
| α - IL-8 (G265-5) | Monoklonaler Antikörper (IgG2b) gegen humanes Interleukin 8 (Maus, Pharmingen) |
| α - M45 | Polyklonaler Antikörper gegen das m45-Epitop des adenoviralen E4-6/7 Proteins (Maus, Obert <i>et al.</i> , 1994) |

| | |
|-------------------------|--|
| α - P-Tyr (PY99) | Monoklonaler Antikörper gegen tyrosinphosphorylierte Proteine (Maus, Santa Cruz Biotechnology) |
| α - RecA (AK263) | Polyklonales Antiserum gegen das RecA-Protein von <i>H. pylori</i> P1 (Kaninchen) (Fischer and Haas, 2004) |
| α - UreB (AK201) | Polyklonales Antiserum gegen die B-Untereinheit der Urease von <i>H. pylori</i> (Kaninchen) |

Sekundäre Antikörper

| | |
|-------------------|--|
| Maus IgG-POX | Meerrettichperoxidase (POX)-gekoppelter polyklonaler Antikörper gegen Maus-IgG (Ziege) (Dianova) |
| Kaninchen IgG-POX | Meerrettichperoxidase (POX)-gekoppelter polyklonaler Antikörper gegen Kaninchen-IgG (Ziege) (Dianova, Sigma-Aldrich) |
| Maus IgG-AP | Alkalische Phosphatase (AP)-gekoppelter polyklonaler Antikörper gegen Maus-IgG (Kaninchen) (Sigma-Aldrich) |
| G265-8 | Biotin-gekoppelter monoklonaler Antikörper (IgG2b) gegen humanes IL-8 (Maus) (Pharmingen) |

1.6 Enzyme und Proteine

Proteine

Alkalische Phosphatase (AP)-gekoppeltes Protein A (Sigma-Aldrich)
 Meerrettichperoxidase (POX)-gekoppeltes Streptavidin (Pierce)
 Rinderserumalbumin (BSA) (Biomol)
 Fetales Kälberserum (FCS) (Gibco/Invitrogen)
 Pferdeserum (PAA)
 Protein G-Agarose (Roche Applied Science, Mannheim, D)

Enzyme

Restriktionsenzyme (Roche Applied Science)
 Expand High Fidelity *Taq* Polymerase (Roche Applied Science)
 T4-DNA-Ligase (Roche Applied Science)
 Expand *Taq* Polymerase (Roche);
 TaKaRa LA® *Taq*-Polymerase (Takara Bio Inc.)
 RNase (Qiagen)
 Lysozym (Boehringer, Mannheim)

26

| | |
|--------------------------------|--|
| Doppelselektiv-Minimalmedium: | 26,7 g/l SD-Base (Clontech, Kalifornien) |
| Doppelselektiv-Platten: | 0,64 g/l -Leu/-Trp DO Supplement (Clontech, Kalifornien) |
| | 26,7 g/l SD-Base (Clontech, Kalifornien) |
| | 0,64 g/l -Leu/-Trp DO Supplement (Clontech, Kalifornien) |
| | 40 g/l Agar |
| Trippelselektiv-Minimalmedium: | 26,7 g/l SD-Base (Clontech, Kalifornien) |
| | 0,60 g/l -Ade/-His/-Leu/-Trp DO Supplement (Clontech, Kalifornien) |
| | 15 ml Adenin (aus 0,2% Stammlösung, Hemisulfatsalz) |
| Trippelselektiv-Platten: | 26,7 g/l SD-Base (Clontech, Kalifornien) |
| | 0,60 g/l -Ade/-His/-Leu/-Trp DO Supplement (Clontech, Kalifornien) |
| | 40 g/l Agar |
| | 15 ml Adenin (aus 0,2% Stammlösung, Hemisulfatsalz) |

Alle Nährmedien wurden mit entsalztem und filtriertem Wasser aus einer Reinstwasseranlage (Memtech, Moerenweis, D) angesetzt und in Wasserdampfhochdruckautoklaven SterimaquetTM (Maquet/Getinge, Rastatt, D) für 20 min bei 121°C und 1,013 x 10⁵ Pascal Überdruck sterilisiert. Hitzelabile Substanzen wie Antibiotika, Vitamine, Aminosäuren oder sonstige Reagenzien wurden sterilfiltriert (Sterilfilter 0,2 µm Porengröße) und den jeweiligen Nährmedien nach dem Autoklavieren bei max. 55°C Medientemperatur unter sterilen Bedingungen zugegeben.

1.9 Antibiotika und Zusätze für Selektivmedien

Chloramphenicol und Nystatin wurden von Merck (Darmstadt, D), alle weiteren Antibiotika und Zusätze von Sigma-Aldrich (St. Luis, USA) bezogen.

| Medienzusatz | Abkürzung | Lösungsmittel | Arbeitskonzentration |
|-----------------------|-----------|------------------|--|
| Ampicillin | Amp | H ₂ O | 100 mg/l |
| Chloramphenicol | Cam | EtOH | 30 mg/l (LB-Medium/-Platten) 6 mg/l (Serum-Platten) |
| Gentamicin | Gen | H ₂ O | 10mg/l |
| Kanamycin | Kan | H ₂ O | 50 mg/l (LB-Medium/-Platten) 8 mg/l (Serum-Platten) |
| Vancomycin | - | H ₂ O | 10 mg/l (Serum-Platten) |
| Trimethoprim | - | H ₂ O | 5 mg/l (Serum-Platten) |
| Nystatin | - | H ₂ O | 1 mg/l (Serum-Platten) |
| Leucin | Leu | H ₂ O | 100 mg/l |
| Tryptophan | Trp | H ₂ O | 20 mg/l |
| Adenin | Ade | H ₂ O | 30 mg/l |
| 3-Amino-1,2,4-Triazol | 3-AT | H ₂ O | 5 mM |

1.10 Puffer und Lösungen

Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen wurden wie die Nährmedien mit entsalztem und filtriertem Wasser aus einer Reinstwasseranlage (Memtech, Moerenweis, D) hergestellt und sind entsprechend bei der jeweiligen Methode aufgelistet, bei der sie zum Einsatz kamen.

Allgemeine Lösungen:

10 x PBS: 2 g/l KCl, 80 g/l NaCl, 2 g/l KH_2PO_4 , 14,4 g/l Na_2HPO_4

1 x PBS: 10% (v/v) 10 x PBS in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$

2 x SDS-Probenpuffer: 100 mM Tris-HCl pH 6,8, 200 mM DTT, 4% (w/v) SDS, 20% (v/v) Glycerin, 10% (v/v) β -Mercaptoethanol, 0,2% (w/v) Bromphenolblau

1.11 Chemikalien und Reagenzien

Im Folgenden sind die wichtigsten Chemikalien aufgeführt. Sie wurden von Merck (Darmstadt, D), Roth (Karlsruhe, D) oder Sigma-Aldrich (St. Luis, USA) bezogen. Spezielle Reagenzien sind bei den entsprechenden Methoden aufgeführt.

| | |
|--|----------------------------------|
| Acrylamid/Methylenbisacrylamid 29:1 (30 %) | (Roth) |
| Agarose | (Sigma-Aldrich) |
| 5-Brom-3-chlor-indolylphosphat-p-Toluidinsalz (BCIP) | (Roth) |
| Bromphenolblau | (Serva, Heidelberg, D) |
| Coomassie Brilliant Blue R250 | (Biomol, Hamburg, D) |
| Desoxyribonukleinsäure-(dNTP-) Mix | (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D) |
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA) | (Sigma-Aldrich) |
| Ethidiumbromid | (Sigma-Aldrich) |
| Leupeptin | (Sigma-Aldrich) |
| Methylenblau | (Sigma-Aldrich) |
| Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS) | (Pharmacia) |
| Natrium-Orthovanadat | (Roth) |
| Sephadex G-50 | (Pharmacia) |
| Nitrotetrazoliumblausulfat (NBT) | (Roth) |
| Pepstatin A | (Sigma-Aldrich) |
| Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) | (Merck) |
| N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamin (TEMED) | (Sigma-Aldrich) |
| Tween 20 | (Sigma-Aldrich) |

1.12 Verbrauchsmaterialien und Hilfsmittel

Untenstehende Auflistung gibt einen Überblick über die wichtigsten verwendeten Verbrauchsmittel.

| | |
|---|------------------------------------|
| 96-DeepWell-Block (2,2ml) | (ABgene, Epsom, Surrey, UK) |
| 96-DeepWell-Block (1,2ml) | (ABgene, Epsom Surrey, UK) |
| ELISA Maxisorp Platten | (Nunc, Wiesbaden, D) |
| Einfrierröhrchen 1,5 ml | (Nalgene/Nalge Nunc, Wiesbaden, D) |
| Falcon Röhrchen 15 ml, 50 ml | (Falcon, BD, Franklin Lakes, USA) |
| Filterpapiere Whatman [®] | (Whatman, Brentford, UK) |
| Gas permeable adhesive seals | (ABgene, Epsom, Surrey, UK) |
| Adhesive Plate Seals | (ABgene, Epsom, Surrey, UK) |
| OmniTray Zellkultur-Platten | (Nunc, Wiesbaden, D) |
| Petrischalen | (Greiner, Kremsmünster, A) |
| Einmalpipetten und -spitzen | (Gilson, Middleton, USA) |
| PVDF-Membran | (BioRad, Hercules, USA) |
| Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml | (Eppendorf, Hamburg, D) |
| Röntgenfilme Super RX | (Fuji Film, Düsseldorf, D) |
| Einmal-Spritzen Omnifix [®] 50 ml, 25 ml, 5 ml | (Braun, Melsungen, D) |
| Sterilfilter 0,22 µm | (Josef Peske GmbH, Aindling, D) |
| Zellkulturschalen und -flaschen | (Nunc, Wiesbaden, D) |
| Zellschaber | (Falcon, BD, Franklin Lakes, USA) |

1.13 Apparaturen und Geräte

| | |
|--|---|
| Anaerobenbrutschrank Microincubator MI22C | (Scholzen, Wittenbach, CH) |
| Anaerobiertöpfe | (Fritz Gößner GmbH, Hamburg, D) |
| Agarose-Gelkammern Wide Mini-Sub [®] cell | (BioRad, Hercules, USA) |
| Blot-Apparaturen <i>semi-dry</i> | (Biotech Fischer, Reiskirchen, D) |
| Brutschränke FED | (Binder, Tuttlingen, D) |
| Elektroporationsgerät Gene Pulser [™] | (BioRad, Hercules, USA) |
| ELISA-Reader GENios | (Tecan, Oxford, PA) |
| French Press SIM-AMINCO | (Spectronic Instruments, Rochester, USA) |
| Geldokumentationssystem Quantity One 4.4.0 | (BioRad, Hercules, USA) |
| Magnetrührer mit Heizung MR 3001 | (Heidolph, Schwabach, D) |
| Fluoreszenzmikroskop Leitz DM RBE mit | |
| Digitalkamera | (Leica, Mannheim, D) |
| PAGE-Mini Gelkammern | (BioRad, Hercules, USA) |
| pH-Meter ProfiLine pH 197i | (WTW, Weilheim, D) |
| Photometer DR/2000 | (Hach, Bremen, D) |
| SMART [®] -Anlage | (Amersham Biosciences, Freiburg, D) |
| Schüttelinkubatoren Certomat R BS-1 | (Braun Biotech/Sartorius BBI Systems, Göttingen, D) |
| Spannungsquellen Power Pac 300 | (BioRad, Hercules, USA) |
| Spektralphotometer Ultrospec [™] 3100pro | (Amersham/Biosciences, Freiburg, D) |

| | |
|--|--|
| Sterilbank | (BDK Luft-und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen) |
| Thermocycler Microcycler Personal | (Eppendorf, Perkin Elmer, Wellesley, USA) |
| Ultraschallgerät Sonifier II 450 | (G. Heinemann, Ultraschall- u. Laborgeräte, Schwäbisch Gmünd, D) |
| Vortex Gene 2 | (Scientific Industries) |
| Wasserbäder 1012 | (GFL, Burgwedel, D) |
| Zentrifuge RC5C Plus (Rotoren SS34, SLA3000) | (Sorvall, Langenselbold, D) |
| Tischzentrifugen Megafuge 1.0R, Biofuge 15R, Biofuge 15 | (Heraeus, Hanau, D) |
| Ultrazentrifuge Optima™ TL (Rotoren TLA45, TLA1003) | (Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA) |
| Vakuumzentrifuge Savant SpeedVac DNA 110 | (GMI, Ramsey, USA) |

1.14 Computerprogramme zur Analyse von Proteinsequenzen

Die Vorhersagen zur Topologie von Transmembrandomänen der von der *cag*-Pathogenitätsinsel kodierten Proteine wurden mit dem PHDhtm Programm (Rost *et al.*, 1995) des Predict Protein Servers (<http://cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein>) oder alternativ mit den TMPred (<http://www.ch.embnet.org/index.html>) oder TMHMM (Krogh *et al.*, 2001) Algorithmen durchgeführt. Signalsequenzen wurden durch die Programme SignalP oder PSORT vorhergesagt (Nakai *et al.*, 1991; Nielsen *et al.*, 1997), Coiled coils durch die Benutzung des COILS Algorithmus (Lupas *et al.*, 1991).

2. Methoden

2.1 Arbeiten mit Bakterien

2.1.1 Kultivierung von Bakterien

Escherichia coli

Escherichia coli-Stämme wurden auf Luria-Bertani- (LB-) Agarplatten kultiviert, die bei Bedarf mit den jeweiligen Antibiotika zur Selektion hergestellt worden waren. Die Anzucht von Flüssigkulturen fand entsprechend in LB-Flüssigmedium statt. Die Inkubation erfolgte aerob bei 37°C in einem Brutschrank bzw. Schüttelinkubator. Für Proteinexpressions-experimente wurden Temperaturen von 27°C bis 37°C eingesetzt.

Die Stammhaltung erfolgte in Glycerin-Gefrierkulturen. Dazu wurde eine Einzelkolonie auf ½ Agarplatte ausgestrichen und das Koloniematerial nach ca. 14 h Wachstum in 1 ml Einfriermedium (LB mit 20% Glycerin) suspendiert und bei -70°C eingefroren.

Helicobacter pylori

Helicobacter pylori wurde auf Serumplatten oder gegebenenfalls auf antibiotikahaltigen Serum-Selektivplatten unter mikroaerophilen Bedingungen (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂) bei 37°C inkubiert. Flüssigkulturen wurden in Brucella-Medium, supplementiert mit 10% FCS, bei 80 rpm in einem Anaerobiotopf im Rundschüttler angezogen.

Für die Stammhaltung wurde Zellmaterial einer halben dicht bewachsenen Serumplatte in 1ml Brucella-Medium mit 20% Glycerin und 10% FCS suspendiert und bei -70°C eingefroren.

Zur Rekultivierung wurden *H. pylori*-Stämme aus der Gefrierkultur auf Serumplatten ausgestrichen und 48 h bei 37°C bebrütet. Nach ein- bis zweimaligem Überimpfen auf neue Platten wurden die Bakterien für Experimente verwendet.

2.1.2 Messung der optischen Dichte von Bakterien

Die Bestimmung der optischen Dichte (OD) einer Bakteriensuspension erfolgte in Kunststoffküvetten in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von $\lambda = 550$ nm (OD₅₅₀). Dazu wurden Bakterien entweder von Platte abgenommen und im gewünschten Medium bzw. PBS resuspendiert, oder es wurde ein Aliquot aus einer Flüssigkultur entnommen. Nach entsprechender Verdünnung, falls notwendig, fand die Bestimmung der optischen Dichte gegen den jeweiligen Blindwert statt.

2.1.3 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*- Stämme

Die Herstellung chemokompetenter Zellen erfolgte nach der Rubidium-Chlorid-Methode (Hanahan, 1983, Messing and Vieira, 1982). Dazu wurden 100 ml LB-Medium mit 5 ml einer Übernachtskultur *E. coli* angeimpft und bis zu einer OD₅₅₀ von 0,5-0,6 bei 37°C, 180 rpm, im Schüttler inkubiert. Die Zellen wurden auf Eis gekühlt und durch Zentrifugation (2300 x g, 15 min, 4°C) sedimentiert. Nach dem Resuspendieren des Zellpellets in 20 ml TFB I und anschließender Inkubation auf Eis für 5 min wurde erneut zentrifugiert. Abschließend konnten

die Zellen in TFB II resuspendiert und nach 15-minütiger Inkubation auf Eis in 50 µl Aliquots schockgefroren und bei -70°C gelagert werden.

TFB I: 30 mM Kaliumacetat, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂,
15 % (v/v) Glycerin; pH 5,2 mit 0,2 M Essigsäure eingestellt; sterilfiltriert
TFB II: 10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl; 15 % (v/v) Glycerin;
pH 6,5 mit KOH eingestellt; sterilfiltriert

2.1.4 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Zur chemischen Transformation von *E. coli*-Zellen wurde ein Aliquot kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut, 3-5 µl Ligationsansatz bzw. 1-2 µl Plasmid-DNA zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen einem Hitzeschock (90 s bei 42°C) unterzogen und anschließend zur Regeneration 1 min auf Eis inkubiert. Dem Transformationsansatz wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz 1 h bei 37°C geschüttelt. Geeignete Aliquots des Ansatzes wurden auf LB-Selektivplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.1.5 Konjugation von *E. coli*

Im Zuge der Mutagenese mit TnMax5 wurden Konjugationsexperimente zur Trennung von mutagenisierten und nicht mutagenisierten Plasmiden durchgeführt.

Zur konjugativen Übertragung eines Plasmids von einem *E. coli*-Stamm in einen anderen wurden Donor-, Mobilisator- und Akzeptor-Stamm auf den entsprechenden LB-Selektivplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach Resuspension der Bakterien in jeweils 1 ml LB-Medium, wurden Suspensionen mit einer OD₅₅₀ = 10 hergestellt und im Verhältnis 1:1:2 (Donor- : Mobilisator- : Akzeptor-Stamm) gemischt. Der 100 µl-Ansatz wurde 2 min bei 6000×g zentrifugiert und der Überstand bis auf 30 µl verworfen. Das in dem Rest des Überstands resuspendierte Pellet wurde auf einen Nitrozellulose-Filter pipettiert, der anschließend auf einer antibiotikafreien LB-Platte liegend 3 h lang bei 37°C im Brutschrank inkubiert wurde. Mit 1 ml LB-Medium wurde der Filter nach der Inkubation in ein steriles 10 ml Röhrchen abgespült. Aus dieser Suspension wurden geeignete Mengen auf entsprechenden LB-Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Als Mobilisator wurde der Stamm HB101[pRK2013], als Empfänger der Stamm E33 (DH5α Rif^R) eingesetzt. Der Mobilisator überträgt dabei sein Plasmid mit den *tra*-Genen auf den Donorstamm, wodurch dieser wiederum sein Plasmid, das nur einen Mobilisierungsursprung trägt, in den Akzeptorstamm übertragen kann.

2.1.6 Transposonmutagenese

Zur Erzeugung von statistisch verteilten Transposoninsertionen (nach Haas et al., 1993) wurde mit dem Minitransposon TnMax5 gearbeitet (Kahrs et al., 1995). Dazu wurden die zu untersuchenden DNA-Fragmente in den Minimalvektor pMin2 kloniert und in den Stamm E181 transformiert, der bereits das gewünschte Transposonplasmid (pTnMax5) enthielt. Dabei wurde auf die Resistenz beider Plasmide (Tet, Cam) selektioniert. Die Transposition wurde über Nacht auf Selektiv-Agarplatten mit 100 µM IPTG induziert. Unter diesen Bedingungen wurden die Gene der Transposase und Resolvase exprimiert. Die entstandenen

Klone enthielten nun neben dem mutagenisierten Zielplasmid auch das ursprüngliche Zielplasmid und das pTnMax5-Plasmid. Nun sollten durch Selektion auf Resistenz und Replikationsursprung das nicht-mutagenisierte Zielplasmid und das pTnMax5-Plasmid eliminiert werden. Da die für die Mutagenese eingesetzten Zielplasmide über einen *oriT* mobilisierbar waren, konnten die induzierten Klone direkt mit dem Stamm E33 (Rif^R) konjugiert werden. Dieser Stamm enthält außer der Insertion des Phagen λ -CH616 noch eine Mutation in der DNA-Polymerase I (*polA1*), was zur Folge hat, dass nicht-mutagenisierte pMin2-Zielplasmide mit ColE1-Replikon nicht mehr vermehrt werden können. Durch Selektion auf die Resistenzdeterminanten von mutagenisiertem Zielplasmid (Tet), Transposon (Cam) und Akzeptorstamm (Rif) wird auf mutagenisierte pMin2-Plasmide selektioniert, da nur diese sowohl mobilisierbar (*oriT*) als auch replikationsfähig (*ori_{id}*) sind. Nicht mutagenisierte Ausgangsplasmide sowie Transposonplasmide bleiben nicht erhalten. Die pTnMax5-Plasmide werden dabei aufgrund der fehlenden Mobilisierbarkeit und das nicht mutagenisierte Ausgangsplasmid wegen der Unfähigkeit in E33 (Rif^R) zu replizieren, ausselektioniert. Die mutagenisierten Plasmide wurden isoliert und über geeignete Restriktionen analysiert. Das TnMax5 Transposon ist zur Einführung von terminierenden Mutationen in Gene konstruiert, weshalb bei der Analyse der Klone nur die Position im mutagenisierten Gen bestimmt wurde.

2.1.7 Transformation von *H. pylori*

Aufgrund der natürlichen Transformationskompetenz von *H. pylori* (Haas *et al.*, 1993) war keine Vorbehandlung der Zellen notwendig. Zur Transformation wurden die Bakterien in Brucella-Medium mit 10% FCS suspendiert und auf eine OD₅₅₀ von ca. 0,2 eingestellt. 1 ml dieser Suspension wurde ½ h bei 37°C unter 10% CO₂ vorinkubiert und nach Zugabe von 1-3 µg DNA weitere 4-5 h im CO₂-Brutschrank stehengelassen. Der Transformationsansatz wurde auf entsprechende Serum-Selektivplatten ausplattiert und unter Standardbedingungen 4-6 Tage inkubiert.

2.1.8 Elektroporation von *H.pylori*

Bei der Elektroporation (modifiziert nach Segal and Tompkins, 1993) wurde von einer *H. pylori* Plattenkultur eine Suspension in PBS hergestellt, von der nach einmaligem Waschen in PBS die optische Dichte (bei OD₅₅₀) bestimmt wurde. Daraus wurde die Menge berechnet, die ca. 10⁹ Bakterienzellen entspricht. Dieser Teil der Suspension wurde entnommen, in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und abzentrifugiert (2300×g, 5 min, 4°C). Das Pellet wurde anschließend in 1 ml Elektroporationspuffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (2300×g, 5 min, 4°C) wurde das Pellet in 40 µl Elektroporationspuffer aufgenommen und in eine auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Dazu wurden etwa 1 µg der zu transformierenden Plasmid-DNA zugegeben und in einer Gene Pulser™ Apparatur bei 2,5 kV, einer Kapazität von 25 µF und einem Widerstand von 200 Ω elektroporiert. Nach dem Puls wurden die Zellen aus der Küvette mit 1 ml BB (+ 10% FCS) Medium gespült, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 h in einem Brutschrank (37°C, 5% CO₂) inkubiert.

Anschließend wurde der Ansatz auf entsprechenden Serumselektivplatten ausplattiert und für ca. 6 Tage in einem Inkubator oder Anaerobentopf inkubiert.

Elektroporationspuffer: 272 mM Saccharose; 15% (v/v) Glycerin; 2,43 mM K_2HPO_4 ; 0,57 mM KH_2PO_4

2.1.9 Zellsubfraktionierung von *H. pylori*

2.1.9.1 Präparation einer *H. pylori*-Gesamtmembranfraktion

Das Bakterienmaterial von 5-10 gut bewachsenen Serumplatten wurde mit einem Wattestäbchen abgenommen, in 2 ml Lysepuffer suspendiert und einmal gewaschen. Anschließend erfolgte der Zellaufschluß mittels Ultraschall auf Eis oder mehreren Passagen durch die French Press. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene Bakterien wurden durch Zentrifugation abgetrennt (10000 x g, 10 min, 4°C). Zum Abtrennen der löslichen Zellfraktion von der Membranfraktion wurde das Lysat 1 h lang bei 100000 x g, 4°C ultrazentrifugiert. Der Niederschlag dieser Zentrifugation wurde als Gesamtmembranfraktion, der Überstand als lösliche Fraktion (Zytoplasma und Periplasma) bezeichnet. Die Gesamtmembranfraktion wurde in Lysepuffer (siehe nächstes Kapitel) resuspendiert und entsprechend weiterverwendet.

2.1.9.2 Differentielle Extraktion der Gesamtmembranfraktion

Zur Trennung innerer und äußerer bakterieller Membranen über differentielle Detergenzextraktion wurde das Pellet der Gesamtmembranfraktion zunächst mit Lysepuffer gewaschen und anschließend im gleichen Puffer resuspendiert. Die Extraktion der Membranproteine erfolgte durch Zugabe von 1% (w/v) N-Lauroylsarkosin oder 1% (w/v) Zwittergens 3-14 und Inkubation für 1 h bei 4°C. Unlösliche Bestandteile wurden durch Ultrazentrifugation für 1h bei 100000 x g abgetrennt.

| | |
|---------------------|---|
| Lysepuffer | 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 |
| | 150 mM NaCl |
| Proteaseinhibitoren | PMSF (1 mM, Serinproteasen), Leupeptin (1 µM, Serin- und Cysteinproteasen), Pepstatin A (1 µM, Aspartatproteasen) |

2.2 Arbeiten mit Hefen

2.2.1 Kultivierung von Hefen

Die Kultivierung von Hefen erfolgte je nach Fragestellung auf YPD-Agarplatten (Vollmedium) oder SD-Base-Agarplatten (Minimalmedium). Flüssigkulturen wurden im entsprechenden Medium ohne Zugabe von Agar angesetzt. Zur Selektion Plasmid-tragender Hefen wurde Minimalmedium verwendet, dem die jeweilige zu selektierende Aminosäure fehlte (Leucin oder Tryptophan). Die Inkubation erfolgte aerob bei 30°C in einem Brutschrank oder Schüttelinkubator.

Zur Stammhaltung wurden Glycerinkulturen angelegt. Hierfür wurden 600 µl einer ü.N.-Flüssigkultur mit 500 µl 80% sterilem Glycerin versetzt und bei -70°C eingefroren.

2.2.2 Messung der optischen Dichte von Hefen

Die Bestimmung der optischen Dichte (OD) einer Hefesuspension erfolgte in Kunststoffküvetten in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600 \text{ nm}$ (OD₆₀₀). Dazu wurde ein Aliquot aus einer Flüssigkultur entnommen und nach entsprechender Verdünnung, falls notwendig, fand die Bestimmung der optischen Dichte gegen den jeweiligen Blindwert statt.

2.2.3 Herstellung kompetenter *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

Für die Herstellung kompetenter Hefestämme wurden 600 ml YPD-Medium mit einer 25 ml ü.N. Kultur des jeweiligen Stammes (AH109 bzw. Y187) inokuliert und bei 30°C ca. 4,5 h bis zu einer OD₆₀₀ = 0,6 geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (930 x g, 5 min, 4°C) geerntet und in SBEG-Lösung (siehe nächstes Kapitel) zum Waschen resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen schließlich in 12 ml SBEG-Lösung aufgenommen. Jeweils 100 µl hiervon wurden pro Transformation eingesetzt.

2.2.4 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*-Stämmen

Zur Transformation von Hefestämmen für den *Yeast-Two-Hybrid*-Assay wurden 5 µl einer Spin-Präparation des jeweiligen Vektors pGADT7 (pGBKT7) zu einem 100 µl-Aliquot des entsprechenden kompetenten Hefestammes AH109 (Y187) gegeben und der Ansatz gemischt. Nach Zugabe von 750 µl PEG/Bicine-Lösung und Mischen des Ansatzes erfolgte eine Inkubation bei 30°C für 1 h mit anschließendem Hitzeschock bei 45°C für 5 min. Daraufhin wurden die Zellen sedimentiert (2700 x g, 2 min), und nach Abnehmen des Überstandes in 1 ml NB-Puffer resuspendiert. 200 µl des jeweiligen Ansatzes wurden auf Selektivplatten (SD-Base, Leu⁻ bzw. Trp⁻) ausplattiert und für 3-6 Tage inkubiert.

| | |
|--------------------|--|
| SBEG-Lösung: | 1 M Sorbitol 10 mM Bicine pH 8,35 3% PEG |
| PEG/Bicine-Lösung: | 40% PEG 200 mM Bicine, pH 8,35 |
| NB-Puffer: | 0,15 M NaCl 10 mM Bicine, pH 8,35 |

alle Lösungen wurden sterilfiltriert.

2.2.5 Generierung diploider *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme durch *Mating*

Das *Mating* und die nachfolgende Selektion diploider Hefen erfolgte wie bereits beschrieben (Uetz *et al.*, 2006). Dazu wurden die haploiden *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme AH109 und Y187 mit den jeweiligen *prey* (pGADT7) und *bait* (pGBKT7)-Plasmiden transformiert. Die Hefestämme mit den verschiedenen *prey*-Plasmiden wurden in 96-well Platten kultiviert und mit einem 384-Nadel-Replikator auf SD-Agarplatten (Leu⁻) gestempelt, woraus ein Anordnung mit acht Kolonien für jedes Konstrukt resultierte. Für das *Mating* wurde diese Masterplatte für jedes *bait*-Konstrukt einmal auf eine YPD-Platte repliziert. Eine 25 ml ü.N.-Kultur der Hefestämme, welche die *bait*-Plasmide trugen, wurde in eine Omnitray Zellkulturschale gegossen und mit dem 384-Nadel-Replikator auf die entsprechende *prey*-Masterplatte transferiert. Die *Mating*-Platten wurden für 24 h bei 30°C inkubiert, wodurch sich die beiden haploiden Hefestämme AH109 (*mating* typ a) und Y187 (*mating* typ α) zu einer diploiden Hefe vereinigen, in der nun beide zu untersuchenden Interaktionspartner exprimiert werden können. Alternativ, um einzelne Interaktionen zu untersuchen, wurden 5 µl der die jeweiligen Konstrukte enthaltenden Hefen in einem Tropfen auf einer YPD-Vollmediumplatte vereinigt und ebenfalls für 24 h bei 30°C inkubiert.

2.2.6 Selektion diploider Hefen nach *Mating* und Screen auf interagierende Proteine

Um nun auf diese diploiden Hefen zu selektionieren, wurden die *Mating*-Ansätze am nächsten Tag auf SD-Medium ohne Leucin und ohne Tryptophan (SD Base Leu⁻/Trp⁻) transferiert und somit alle möglichen Kombinationen von *bait* und *prey*-Plasmiden generiert. Nach etwa 3 Tagen des Wachstums wurden die erhaltenen Hefekolonien auf SD-Medium ohne Leucin, Tryptophan und Histidin (SD Base Leu⁻/Trp⁻/His⁻) zum Screen auf Proteininteraktionen überstempelt. Nur bei interagierenden *bait-prey*-Kombinationen wird das Reportergen zur Histidin-Biosynthese *his3* angeschaltet und den für Histidin-auxotrophen Hefen ist es möglich zu wachsen. Bei nicht interagierenden Proteinen findet kein Wachstum statt. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, die Hefen auf Dreifachselektiv-Platten mit aufsteigenden Konzentrationen (5 mM, 10 mM, 15 mM, 50 mM, 100 mM) des kompetitiven Inhibitors für das Reportergen, 3-AT (3, 4, 5-Aminotriazole), zu überimpfen. Schwach autoaktivierende *bait*-oder *prey*-Konstrukte können so am Wachstum gehindert werden und falsch-positive Interaktionen minimiert werden. Nach 3-6 Tagen Inkubation bei 30°C im Brutschrank wurde das Wachstum ermittelt und mittels Digitalkamera festgehalten.

Einzelne Interaktionen von Interesse wurden in Verdünnungsreihen untersucht und verifiziert. Wie bereits beschrieben (Busler *et al.*, 2006), wurde Koloniematerial der *Mating*-Platte in flüssiges Doppelselektivmedium angeimpft und für etwa 3 Tage täglich weitergeführt. Von den darin gewachsenen Hefen wurde die OD₆₀₀ bestimmt. Nach Einstellen von OD₆₀₀ = 0,26 in 100 µl wurden Verdünnungsreihen von 10⁻¹-10⁻⁵ in Dreifachselektiv-Medium angesetzt. Jeweils 10 µl pro Verdünnungsstufe (in 3 Parallelen) wurden auf SD-Mediumplatten ohne Leucin, Tryptophan und Histidin aufgetropft, bei 30°C im Brutschrank inkubiert und das Wachstum nach 3-6 Tagen ermittelt. Gleichzeitig wurden zur Untersuchung der Lebensfähigkeit der Hefen 10 µl-Aliquots der Verdünnungsreihen, ebenfalls in 3 Parallelen, auf Doppelselektiv-Platten ohne Leucin und Tryptophan aufgetropft und mit den Dreifachselektiv-Ansätzen inkubiert und das Wachstum dokumentiert.

2.2.7 β-Galaktosidase Assay

Diploide Hefen, die auf SD-Selektivmedium ohne Leucin/Tryptophan/Histidin wuchsen, wurden weitergehend auf ihre β-Galaktosidase-Aktivität mit dem Yeast β-Galactosidase Assay Kit (Pierce, Rockford, USA) untersucht. Es kam daraus das „Microplate Plate Assay Protocol (non-stopped)“ zur Anwendung. Hierfür züchtet man die Hefen für 16-24 h in Doppelselektivmedium (SD Base Leu⁻/Trp⁻) an bis zu einer optischen Dichte OD₆₆₀ = 0,6-0,8. Nach Messen der optischen Dichte werden 100 µl der Kultur in den Assay eingesetzt. Die Zellsuspension wird mit 100 µl der Arbeitslösung, zu gleichen Teilen bestehend aus Assay- und Lysepuffer zur Proteinextraktion, nach Angaben des Herstellers, gemischt und der Ansatz bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach 20-40 min wird die Absorption bei 420 nm im Spektralphotometer ELISA-Reader GENios (Tecan) gegen die Referenzwellenlänge von 660 nm gemessen und die Inkubationszeit festgehalten. Die β-Galaktosidase-Aktivität lässt sich dann nach folgender Formel berechnen:

$$\beta\text{-Galaktosidase-Aktivität (in Miller Units)} = 1000 \times A_{420}/t \times V \times OD_{660}$$

t = Inkubationszeit (in min)

V = eingesetztes Volumen an Zellen in Assay (in ml)

2.3 Arbeiten mit Zellkulturen

2.3.1 Kultivierung von Zelllinien

Kultivierung von AGS-Zellen

AGS-Zellen wurden in RPMI-Medium mit 10 % FCS kultiviert. Die Zellen wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen bei 37°C unter 5% CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert und vor Bildung eines konfluenten Rasens verdünnt. Dazu wurde einmal mit PBS gewaschen und die Zellen mit 3 ml Trypsinlösung behandelt. Das Ablösen der Zellen nach einigen Minuten wurde mikroskopisch kontrolliert und das Trypsin durch Zugabe von 5 ml Medium mit FCS inaktiviert. Anschließend wurde ein Teil der Zellen in eine neue Zellkulturflasche mit Medium umgesetzt.

Kultivierung von J774A.1 Makrophagen

Die adhärente Maus-Makrophagen-Zelllinie J774A.1 wurde in DMEM-Medium mit 10% FCS bei 37°C und 10% CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Von einer nahezu konfluent gewachsenen Kultur wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen einmal mit PBS gewaschen, um Mediumreste und abgelöste Zellen zu entfernen. J774A.1-Zellen halten einer Trypsin-Behandlung nicht stand, weshalb die Zellen mit einem sterilen Zellschaber in DMEM-Medium abgeschabt wurden. Die Passage erfolgt alle 3 Tage, wobei die Zellen 1:6 in 75 cm²-Zellkulturflaschen verdünnt wurden.

2.3.2 Auftauen und Einfrieren von Zelllinien

Auftauen:

Die in Kryoampullen bei -180°C aufbewahrten Zellen wurden aus dem Stickstoff entnommen und zunächst auf Eis transportiert. Anschließend wurden die Zellen im Wasserbad bei 37°C zügig aufgetaut und in 10 ml vorbereitetes, der Zelllinie entsprechendes, Medium mit 10% FCS überführt. Danach wurde 5 min bei 200 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen über Nacht in Zellkulturmedium, supplementiert mit 15% FCS, kultiviert. Die Vitalität und Dichte der Zellen wurde am nächsten Tag überprüft und diese, falls erforderlich, verdünnt.

Einfrieren:

Die Zellen einer konfluent bewachsenen 75 cm²-Zellkulturflasche wurden in zwei Kryoröhrchen eingefroren. Dazu wurden die Einfrierröhrchen auf Eis gekühlt, die Zellen mit Hilfe von Trypsin bzw. einem Zellschaber in Suspension gebracht und 10 min bei 200 x g abzentrifugiert. Das 1-2 x in 5 ml Medium gewaschene Zellpellet wurde auf Eis in 1,5 ml gekühltem Medium mit 20% FCS resuspendiert. Anschließend wurde tropfenweise die gleiche Menge Einfriermedium zugegeben und in 1,5 ml Aliquots je Kryogefäß portioniert. Das Einfrieren erfolgte erst bei -70°C für 24 h, anschließend die dauerhafte Lagerung in flüssigem Stickstoff.

Einfriermedium: DMEM oder RPMI, 20% FCS, 15% DMSO, sterilfiltriert

2.3.3 Zellzahlbestimmung mit der Neubauer Zählkammer

Die Bestimmung der Zellzahl einer Zellsuspension erfolgte mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer. Dazu wurde ein Aliquot in die Zählkammer pipettiert und die Zellen in vier Quadraten der Kammer ausgezählt. Aus dem gebildeten Mittelwert wurde die Zellzahl pro ml nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

2.3.4 Infektionsexperimente mit *H. pylori*: Phosphotyrosin-Assay

Zum Nachweis der Translokation des Effektorproteins CagA wurden 1×10^6 Zellen für 4 h Stunden mit *H. pylori* mit einer MOI von 100 infiziert. Dafür wurden *H. pylori*-Zellen von einer gut bewachsenen Platte mit einem Wattestäbchen abgenommen und in Brucella-Medium resuspendiert. Anschließend wurde die optische Dichte OD₅₅₀ bestimmt. Vor Infektion der eukaryontischen Zellen mit den Bakterien wurde das alte Zellkulturmedium durch frisches ersetzt. Die Zellen wurden dann mit der *H. pylori*-Suspension mit einer OD₅₅₀ = 0,1 infiziert. Die Infektion wurde nach 4 h bei 37°C und 5% CO₂ auf Eis gestellt und jeder Infektionsansatz mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen in 1 ml PBS* mit einem Zellschaber abgeschabt. Durch Zentrifugation (400 x g, 5 min, 4°C) wurden die Zellen sedimentiert und anschließend in 25 µl PBS* und 30 µl 2 x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Nach Aufkochen der Lysate für 10 min bei 96°C und Zentrifugation bei 12000 x g für 5 min, wurden die Proben über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert.

PBS* enthält neben den Proteaseinhibitoren PMSF (Serinproteasen), Leupeptin (Serin- und Cysteinproteasen) und Pepstatin A (Aspartatproteasen) den Tyrosinphosphataseinhibitor Na-Vanadat.

PBS*: PBS, 1 mM EDTA, 1 mM Na-Vanadat, 1 mM PMSF, 1 µM Leupeptin,
 1 µM Pepstatin

2.3.5 Messung der IL-8 Produktion von AGS-Zellen mittels Sandwich-ELISA

Durch ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) können geringe Mengen an Proteinen mittels spezifischer Antikörper bestimmt werden. Im Sandwich-ELISA wird ein so genannter „Fangantikörper“, welcher das entsprechende Antigen, hier IL-8, in einer komplexen Proteinlösung binden kann, in den Näpfen einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Die Detektion erfolgt über einen direkt oder indirekt markierten Sekundärantikörper, der gegen ein anderes Antigenepitop als der Fangantikörper gerichtet ist.

AGS-Zellen wurden mit *H. pylori*-Stämmen (MOI = 100) infiziert. Bevor die Zellen abgeschabt wurden, wurde ein 1 ml Aliquot des Kulturüberstandes abgenommen und bei 4000 x g, 10 min zentrifugiert, um ganze Zellen und Bakterien abzutrennen. Der resultierende Überstand wurde zur Quantifizierung von IL-8 mittels Sandwich-ELISA eingesetzt. Die Bestimmung der IL-8-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen erfolgte mit dem OptEIA™ Human IL-8 Set von Pharmingen (BD Biosciences Pharmingen) nach Anleitung des Herstellers.

2.4 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.4.1 Quanti- und qualitative Analyse von DNA

Zur quantitativen Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäurelösungen (Clark *et al.*, 1977) wurde ein geeignetes Aliquot mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ verdünnt (meist 1:50) und in einem Spektralphotometer (UltraspecTM 3100 pro, Amersham Biosciences) vermessen. Für die Konzentrationsberechnungen gilt bei einer Schichtdicke von 1 cm in Näherung folgender Zusammenhang (Cryer *et al.*, 1975):

| | |
|--------------------------|--|
| doppelsträngige (ds) DNA | $\text{OD}_{260} = 1 \approx 50 \mu\text{g ds DNA/ml}$ |
| einzelsträngige (ss) DNA | $\text{OD}_{260} = 1 \approx 31 \mu\text{g ss DNA/ml}$ |

Verunreinigungen können durch Bestimmung der Extinktionen bei 230, 260 und 280 nm bestimmt werden, indem die Quotienten $\text{E}_{260}/\text{E}_{280}$ und $\text{E}_{260}/\text{E}_{230}$ gebildet werden. Eine ausreichende Reinheit der isolierten Nukleinsäuren kann bei folgenden Richtwerten (Marmur J., 1961; Sambrook *et al.*, 1989) angenommen werden:

$$\begin{aligned}\text{E}_{260}/\text{E}_{280} &\geq 1,8 \\ \text{E}_{260}/\text{E}_{230} &\geq 2,2\end{aligned}$$

2.4.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) stellt ein enzymatisches *in vitro*-Verfahren zur spezifischen Amplifikation von DNA-Fragmenten dar (Saiki *et al.*, 1988). Dazu werden zwei kurze Oligonukleotide (meist 18-25 bp) eingesetzt, die sich nach Hitzedenaturierung des DNA-Doppelstranges gerichtet an komplementäre DNA-Einzelstränge (Template) anlagern (Annealing) und somit den zu amplifizierenden Bereich flankieren. Die Verlängerung (Elongation) der Primer entlang der denaturierten DNA-Matrize findet mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase und den im Reaktionspuffer enthaltenen Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dNTPs) statt. Um eine erneute Primeranlagerung nach der Elongation zu ermöglichen, wird die DNA zu Beginn jedes Zyklus neu denaturiert. Auf diese Weise kommt es zur exponentiellen Amplifikation der DNA.

Zur Klonierung wurde eine PCR mit Expand- oder TaKaRa-*Taq*-Polymerase und dem dazugehörigen Puffersystem durchgeführt. Beide Polymerasen zeichnen sich durch eine 3'-5'-Korrekturlesefunktion aus, die eine geringe Fehlerwahrscheinlichkeit verspricht. Als Matrize wurde chromosomale DNA (unverdünnt oder 1:20) oder Plasmid-DNA (1:100) eingesetzt. Je nach Anwendung wurden die PCR-Ansätze in einem Gesamtvolumen von 25, 50 oder 100 μl durchgeführt. Pro 100 μl Ansatz wurden 1 μl Template-DNA, je 100 pmol Oligonukleotide, je 20 nmol dATP/dGTP/dTTP/dCTP sowie 2 U *Taq*-Polymerase verwendet. MgCl_2 wurde je nach Anwendung in einer Endkonzentration von 1,5 mM oder 3 mM eingesetzt. Die Temperatur-Zeit-Zyklen, die zur PCR-Amplifikation verschiedener Matrizen-DNAs eingesetzt wurden, sind in Tabelle 2 dargestellt. Abhängig von der Länge des zu amplifizierenden Genabschnittes wurde die Dauer der Elongation angepasst. Der Erfolg der PCR wurde mittels TAE-Agarosegelelektrophorese überprüft.

Tabelle II.2.1: Temperatur-Zeit-Zyklen

| Stadium | Temperatur | Zeit |
|-----------------------|------------|------------------|
| Primäre Denaturierung | 94°C | 5 min |
| Denaturierung | 94°C | 1 min |
| Annealing | 45-55°C | 30 Zyklen 30 sec |
| Elongation | 68°C | 60 sec/1000 bp |
| Finale Elongation | 68°C | 10 min |

2.4.3 Präparation von Plasmiden aus *E. coli*

Isolierung von Plasmid-DNA durch Kochpräparation (Holmes and Quigley, 1981)

Zur kostengünstigen Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde eine Einzelkolonie auf einer antibiotikahaltigen LB-Platte ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Eine Impföse Kulturmateriel wurde in 300 µl STET-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 15 µl Lysozym-Lösung wurde der Ansatz 5 min auf Eis inkubiert und anschließend zur Zelllyse 1 min bei 100°C aufgekocht. Durch Zentrifugation (12000 x g, 15-20 min) wurden Zelltrümmer und chromosomale DNA sedimentiert und mit einem sterilen Zahnstocher entfernt. Zur Fällung der Plasmid-DNA wurde der wässrige Überstand mit 200 µl Isopropanol versetzt und 10 min bei -20°C inkubiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 12000 x g wurde der Niederschlag mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen. Die Plasmid-DNA wurde 10 min in einer Vakuumzentrifuge lyophilisiert und in 50 µl sterilem H₂O_{dest} aufgenommen.

STET-Puffer: 8% (w/v) Saccharose, 5% (v/v) Triton X-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl pH 8,0

Lysozym-Lösung: 10 mg/ml in STET-Puffer

Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA mit Qiagen-Säulen

Die zur Transformation in Hefen bzw. zur Sequenzierung eingesetzte Plasmid-DNA wurde säulenchromatographisch mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ von Qiagen (Hilden, D) aufgereinigt. Die Durchführung erfolgte nach Gebrauchsanleitung des Herstellers.

2.4.4 Isolierung chromosomaler DNA aus *H. pylori*

Zur Isolierung von chromosomaler DNA aus *H. pylori* wurde der „QIAamp Tissue Kit“ von Qiagen (Hilden, D) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.4.5 Analytische und präparative Gelelektrophorese von DNA

Für die analytische und präparative Auftrennung von DNA wurde eine horizontale Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Das zugrunde liegende Prinzip ist die Wanderung der negativ geladenen Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld zur Anode, wobei die Auftrennung der Fragmente in der Gelmatrix nach ihrer Größe erfolgt.

Durch die Agarosekonzentration (zwischen 0,8 und 2%) und die Laufzeit kann die optimale Trennung bestimmter Fragmentgrößen beeinflusst werden. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit mind. 1/5 Volumen GEBS-Puffer versetzt. Die Auftrennung der Nukleinsäuren erfolgte bei einer Spannung von 70 V in TAE-Puffer.

Für analytische Zwecke wurden die Gele nach Beendigung des Laufs in einem Ethidiumbromidbad (1 mg/l) angefärbt. Die Dokumentation erfolgte unter UV-Durchstrahlung bei 260 nm mit Hilfe eines Videosystems (Molecular Imager Gel Doc XR System, Bio-Rad).

Für präparative Zwecke wurden Agarosegele mit einer längeren Laufstrecke verwendet und nach erfolgter Auftrennung mit einer 0,1%-igen Methylenblau-Lösung angefärbt. Nach Entfärben des Gels mit Wasser konnten die sichtbaren DNA-Banden auf einem Durchlichttisch ausgeschnitten werden und die DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des „E.Z.N.A.[®] Gel Extraction Kit“ von Peqlab (*peqlab* Biotechnologie GmbH, Erlangen, D) isoliert. Die Durchführung erfolgte hierbei nach Angaben des Herstellers.

| | |
|---------------------|---|
| 50 x TAE-Puffer: | 242 g/l Tris-Base, 57,1 ml/l Eisessig, 50 mM EDTA |
| Methylenblaulösung: | 1 g/l Methylenblau |
| GEBS-Puffer: | 20% (v/v) Glycerin, 50 mM EDTA, 0,05% (w/v) Bromphenolblau, 0,5% (w/v) N-Laurylsarcosin |

2.4.6 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionen analytischer Plasmid-DNA erfolgten in einem Gesamtvolumen von 10 µl mit Restriktionsenzymen von Roche Applied Science und den entsprechenden Puffersystemen. Es wurden etwa 2-5 U der entsprechenden Enzyme zur Hydrolyse von ca. 1 µg DNA bei 37°C für 2 h eingesetzt. Der Erfolg der Spaltung wurde durch Auftragen in der Agarosegelelektrophorese analysiert.

Präparative Restriktionen wurden in Volumina von 50-60 µl durchgeführt. Dabei wurde entsprechend mehr Enzym (15 U) eingesetzt sowie die Inkubationszeit auf 4 h verlängert, um eine möglichst vollständige Restriktion der DNA zu erreichen. Die Inaktivierung der Enzyme erfolgte durch Zugabe von GEBS (mind. 1/5 des Ansatzvolumens). Die Restriktionen wurden über präparative Agarosegele (siehe **Kapitel II.2.4.5**) aufgereinigt.

2.4.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Für Ligationen wurden in 10 µl Gesamtvolumen 1 µl 10 x Ligationspuffer und 1 U T4-DNA-Ligase (Roche Applied Science) sowie das zu inserierende DNA-Fragment und der geschnittene Vektor im Verhältnis 3:1 eingesetzt. Die Inkubation erfolgte entweder 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Für die nachfolgende Transformation in *E. coli* wurden 2-5 µl des Ligationsansatzes verwendet.

2.4.8 Rekombinatorische Klonierung nach Gateway®-Technologie

Die Gateway®-Technologie ist eine universelle Klonierungsmethode, die Vorteile einer sequenz-spezifischen Rekombination des Bakteriophagen Lambda nutzt, um einen schnellen und höchst effizienten Weg für das Einsetzen von DNA-Sequenzen in verschiedene Vektorsysteme zu ermöglichen. Dabei kann ein DNA-Fragment des Interesses (z.B. ein PCR-Produkt, cDNA oder genomische DNA), versehen mit *attB*-attachement sites (*attB1*, *attB2*) mit einem Donorvektor (z. B. pDONR™207) in der sogenannten BP-Clonase™-Reaktion rekombiniert werden. Der Donorvektor trägt neben einer Gentamicin- Resistenzkassette eine Kassette bestehend aus Chloramphenicol-Resistenz und dem *ccdB*-Gen, einem F-Plasmid kodierten Gen, das das Wachstum von *E.coli* inhibiert, flankiert von zwei *attP*-attachement sites (*attP1*, *attP2*). In der BP-Reaktion werden die B- und P-attachement sites miteinander rekombiniert, was zur Folge hat, dass das DNA-Fragment von Interesse gegen die *ccdB*-Genkassette ausgetauscht wird. Außerdem entstehen neue *attL*-attachement sites (*attL1*, *attL2*), die das DNA-Fragment jetzt flankieren. Der Erfolg dieser Reaktion wird zunächst über die nun erhaltene Chloramphenicol-Sensitivität überprüft und geeignete Klone werden über Restriktionsanalyse mit geeigneten Schnittstellen verifiziert. Ausgehend von diesem Donorvektor können nun die Fragmente in verschiedenste Zielvektoren über die LR-Clonase™-Reaktion eingesetzt werden, vorausgesetzt, diese enthalten ebenfalls die *ccdB*-Genkassette, diesmal allerdings flankiert von *attR*-attachement sites (*attR1*, *attR2*).

Die hier beschriebene Technologie wurde in der vorliegenden Arbeit dazu benutzt, die Gene, die im *Yeast-Two-Hybrid*-Assay zu untersuchenden Proteine, in die Vektoren pGADT7 und pGBKT7 des Matchmaker Systems (Clontech Laboratories, Takara, Kalifornien, USA) zu klonieren. Die entsprechenden Gensequenzen wurden durch eine zweistufige *nested* PCR-Reaktion aus genomischer DNA des *Helicobacter pylori* Stammes 26695 bzw. von GE11β-Zellen amplifiziert. Die DNA wurde unverdünnt bzw. 1:20 verdünnt eingesetzt.

nested PCR-Reaktion für die Rekombinatorische Klonierung

Zunächst wurde eine PCR mit Primern durchgeführt, die aus der internen Vorwärts- und Rückwärts-Sequenz der *attB1*-Rekombinationsstelle sowie den entsprechenden homologen Sequenzen der zu klonierenden Gene bestanden (Primersequenzen siehe unter 1.4). Pro 50 µl Ansatz wurden 1 µl Template-DNA, je 10 pmol Oligonukleotide, je 7 nmol dATP/dGTP/dTTP/dCTP sowie 2 U *Taq*-Polymerase verwendet. MgCl₂ wurde je nach Anwendung in einer Endkonzentration von 1,5 mM oder 3 mM eingesetzt. Folgende Bedingungen wurden zur Amplifikation der DNA-Matrizen eingesetzt:

Tabelle II.2.2: *nested* PCR 1, Temperatur-Zeit-Zyklen

| Stadium | Temperatur | Zeit |
|-----------------------|------------|---------------------|
| Primäre Denaturierung | 94°C | 2,5 min |
| Denaturierung | 94°C | 15 sec |
| Annealing | 50-60°C | 10-15 Zyklen 60 sec |
| Elongation | 68°C | 60 sec/1000 bp |

Im Anschluß daran wurde gleich eine 2. PCR-Reaktion angehängt, in der die genspezifischen Amplifikate der ersten PCR-Reaktion als Template für die 2. Reaktion dienten. Die Primer waren für alle Ansätze gleich, sie bestanden aus dem *attB1*-externen Vorwärts- und dem *attB2*-externen Rückwärtsprimer (siehe auch unter **Kapitel II.1.4**). Durch diese Reaktion werden die spezifischen *attB1* und *attB2* Rekombinationsstellen am PCR-Produkt vervollständigt. Pro 50 µl Ansatz wurden 10 µl der ersten PCR-Reaktion als Template, sowie 16 pmol Oligonukleotide, je 7 nmol dATP/dGTP/dTTP/dCTP sowie 2 U *Taq*-Polymerase verwendet. MgCl₂ wurde je nach Anwendung in einer Endkonzentration von 1,5 mM oder 3 mM eingesetzt. Die Bedingungen zur Amplifikation waren wie folgt:

Tabelle II.2.3: *nested* PCR 2, Temperatur-Zeit-Zyklen

| Stadium | Temperatur | Zeit |
|-------------------|------------|---------------------|
| Denaturierung | 94°C | 15 sec |
| Annealing | 45°C | 5 Zyklen 30 sec |
| Elongation | 68°C | 60 sec/1000 bp |
| Denaturierung | 94°C | 15 sec |
| Annealing | 55°C | 10-15 Zyklen 30 sec |
| Elongation | 68°C | 60 sec/1000 bp |
| Finale Elongation | 68°C | 10 min |

Der Erfolg der PCR wurde mittels TAE-Agarosegelelektrophorese überprüft.

Bei Korrektheit der Produkte konnten diese in die nachfolgenden BP- und LR-Reaktionen eingesetzt werden.

BP-Reaktion

Für die BP-Reaktion wurde der „Gateway® BPCLonase™ Enzyme Mix“ (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers verwendet. Er enthält wie bereits oben beschrieben das Rekombinationsprotein Integrase (Int) des Bakteriophagen Lambda, den *E. coli* kodierten *Integration Host Factor* (IHF) und den nötigen Reaktionspuffer für die *in vitro* Rekombination des *attB*-PCR-Produkts mit dem *attP*-Donorvektor (hier pDONR207™, Gateway, Invitrogen), wobei der *attL*-Eingangsvektor entsteht. Die Korrektheit der

Rekombinationsreaktion wurde über geeignete Schnittstellen mittels Restriktionsanalyse überprüft. Richtige Klone wurden in die LR-Reaktion eingesetzt.

LR-Reaktion

Für die LR-Reaktion wurde der „Gateway® LRClonase™ Enzyme Mix“ (Invitrogen) verwendet. Auch hier erfolgte der Einsatz der jeweiligen Eingangs- und Zielvektoren nach Angaben des Herstellers. Der Enzym-Mix enthält zusätzlich zur Integrase (Int) und dem IHF wie in der BP-Rektion noch eine Excisionase (Xis) des Bakteriophagen Lambda und den nötigen Reaktionspuffer. Die Reaktion katalysiert die Rekombination des *attL*-flankierten Gens im Eingangsvektor mit einem *attR* enthaltenden Zielvektor. Als Zielvektoren wurden die beiden *Yeast-Two-Hybrid*-Vektoren pGADT7 und pGBKT7 (Clontech) verwendet, die die von *attR*-sites flankierte *ccdB*-Konversionskassette, zwischen den *EcoRV* und *SmaI* Schnittstellen, enthalten (Uetz *et al.*, 2006).

2.4.9 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden von den Firmen MWG-Biotech (Ebersberg, D) oder Agowa (Berlin, D) durchgeführt. Die eingesetzten Sequenzierprimer waren entweder Standardprimer (bei käuflichen Plasmiden) oder selbst gewählte Oligonukleotide, die zur Sequenzierung des gewünschten DNA-Abschnittes eingesetzt wurden.

2.5 Arbeiten mit Proteinen

2.5.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration einer Probe (Bradford M.M., 1976) wurden 100 µl einer Proteinlösung, ggf. in PBS verdünnt, mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt und 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 595 nm gegen einen entsprechenden Blindwert. Für jede Proteinbestimmung wurde eine Eichkurve mit bekannten BSA-Konzentrationen aufgenommen.

Um die Proteinkonzentration kleiner Volumina (1 µl) zu bestimmen, wurde der Assay auf das Format einer 96well-Platte skaliert und die Extinktion in einem ELISA-Reader GENios (Tecan) gemessen.

Bradford-Reagenz: 0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250,
 5% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Phosphorsäure (85%-ig)

2.5.2 Herstellung bakterieller Zelllysate

Zur Herstellung von Lysaten wurden Bakterien in PBS suspendiert und auf eine OD₅₅₀ = 15 eingestellt. Die Suspension wurde abzentrifugiert (4000 x g, 5 min), das Bakterienpellet in entsprechendem Volumen PBS aufgenommen und mit 2x SDS-Probenpuffer versetzt. Die Zelllysate wurden vor dem Auftragen auf ein Polyacrylamid-Gel für 10 min bei 96°C gekocht und anschließend bei 12000 x g für 5 min abzentrifugiert.

2.5.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurde mit dem vertikalen Gelelektrophoresesystem Mini-Protein III™ von BioRad durchgeführt, Trenn- und Sammelgele nach Sambrook *et al.*, 1989, angesetzt. Je nach Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine wurden 6%-15%-ige Trenngele eingesetzt, während die Konzentration des Sammelgels stets 5% betrug. Das aufgetragene Probenvolumen betrug 2-15 µl. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteinproben erfolgte zum Einlaufen der Proben ins Sammelgel zunächst bei einer Spannung von 80 V für etwa 15 min, bei Erreichen des Trenngels wurde die Spannung auf 130 V erhöht. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend mit Coomassie angefärbt (siehe 2.5.4) oder auf eine PVDF-Membran übertragen (siehe 2.5.5)

| | |
|-----------------------|--|
| Elektrophoresepuffer: | 250 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS, 25 mM Tris/HCl pH 8,3 |
| Trenngelpuffer: | 1,5 M Tris/HCl pH 8,8 |
| Sammelgelpuffer: | 1,0 M Tris/HCl pH 6,8 |
| Acrylamidlösung: | 29% (w/v) Acrylamid, 1% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid |

2.5.4 Färben aufgetrennter Proteine mit Coomassie

Nach elektrophoretischer Auftrennung können Proteine in Polyacrylamidgelen durch Anfärbung sichtbar gemacht werden. Die Detektion von Proteinen in Polyacrylamidgelen erfolgte mittels Coomassie-Färbung (Marshall and Williams, 1992). Dazu wurden SDS-Gele 20 min in Coomassie-Lösung angefärbt und anschließend so lange in Entfärbelösung geschüttelt, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren.

| | |
|---------------------------|--|
| Coomassie-Färbelösung: | 0,275% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250 in 50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure |
| Coomassie-Entfärbelösung: | 10% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Ethanol, 7,5% (v/v) Essigsäure |

2.5.5 Western Blot

Transfer von Proteinen auf PVDF-Membran

Die gelelektrophoretisch über SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels *semi-dry* Blotsystem durch ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld eluiert und auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran transferiert. Auf der Graphitanode wurde ein Stapel aus zwei dicken und zwei dünnen Whatman-Filterpapieren, einer PVDF-Membran, dem Polyacrylamidgel und wiederum zwei dünnen und zwei dicken Filterpapieren geschichtet. Vor dem Zusammenbau der Blot-Apparatur wurde die PVDF-Membran in Methanol quellen gelassen. Alle Filterpapiere und die Membran wurden mit Westerntransferpuffer getränkt. Der Proteintransfer erfolgte im Allgemeinen bei 1 mA/cm^2 für 90 min. Kleine Proteine ($< 20 \text{ kDa}$) wurden meist nur 60 min, große Proteine ($> 150 \text{ kDa}$) hingegen für 120 min bei gleicher Stromstärke geblottet.

Westerntransferpuffer: 192 mM Glycin, 25 mM Tris,
 20% (v/v) Methanol, 0,1% (w/v) SDS (pH = 8,3)

Immundetektion immobilisierter Proteine

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurden freigebliebene Bindungsstellen auf der Membran für mindestens eine halbe Stunde abgesättigt. Als Puffer wurde entweder TBS/3% BSA oder TBST/5% MMP (Magermilchpulver) eingesetzt. Anschließend wurde das jeweilige Antiserum je nach Titer 1:1000 bis 1:5000 in TBS/3% BSA oder TBST/1% MMP verdünnt und mindestens zwei Stunden inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 10 min in TBST wurde die Membran mit einem Konjugat aus Protein A und alkalischer Phosphatase (Protein A-AP) (1:2000 in TBST) oder einem Peroxidase (POX)-gekoppelten Zweitantikörper (1: 10000 in TBST/1% MMP) für 1 h inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBST wurde die Membran bei Verwendung von Protein A-AP durch Schwenken in 10 ml Detektionslösung entwickelt und die Farbreaktion anschließend mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ abgestoppt. Zum sensitiveren Nachweis über Chemilumineszenz wurden POX-gekoppelte Zweitantikörper eingesetzt, dabei erfolgte die Entwicklung mit ECL™ Western Blot Detektionsreagenzien (General Electrics/Amersham) bzw. Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore Corp., Billerica, USA).

TBS: 150 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl pH 7,5

TBST: TBS, 0,1% (v/v) Tween

Detektionslösung: 0,1 M Tris/HCl pH 9,6, 0,1 g/l NBT, 7 mM MgCl_2 ,
 50 mg/l BCIP

Entfernung von Immunkomplexen von PVDF-Membranen

POX-entwickelte Western Blot-Membranen konnten nach Entfernung der gebundenen Antikörper erneut zur Immundetektion eingesetzt werden. Die Western Blot-Membranen wurden dazu zunächst 5 min bei Raumtemperatur (RT) mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gewaschen, um Reste der Detektionslösung zu entfernen. Zum Aufbrechen der Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgte eine 30-40 minütige Inkubation in 50 mM NaOH bei RT. Dadurch wurden die Antikörper von den immobilisierten Proteinen auf der Membran gelöst. Anschließend wurden die PVDF-Membranen 5 min in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gewaschen, vollständig mit Methanol benetzt und bei RT getrocknet. Die so behandelten Membranen konnten trocken über mehrere Monate gelagert werden. Durch erneutes Benetzen mit Methanol war eine Wiederholung der Immundetektion möglich.

2.5.6 Co-Immunopräzipitation

Um Protein-Protein Interaktionen spezifisch nachzuweisen, wurde die Methode der Immunpräzipitation eingesetzt. Dazu wurde ein Antikörper gegen das gewünschte Protein einem Proteingemisch, beispielsweise einem Zelllysat, zugegeben und anschließend wurde dieses Protein samt Interaktionspartner(n) isoliert. Dies erfolgte mit Hilfe von an Agarosekügelchen gekoppeltem Protein G, welches mit hoher Spezifität an die Fc-Region der meisten Säugetier-Immunglobuline bindet.

Verschiedene *H. pylori*-Stämme wurden auf Agarplatten angezogen, in PBS resuspendiert und gewaschen. Anschließend wurde ein Aliquot einer $\text{OD}_{550} = 15$ (entspricht ca. 5×10^{10} Bakterien) in 500 μl RIPA-Puffer resuspendiert und die Zellen auf Eis durch Ultraschall aufgebrochen. Die Abtrennung nicht aufgeschlossener Zellen und Zelltrümmer erfolgte durch Zentrifugation ($10000 \times g$, 10 min, 4°C). Um unspezifisch bindende Proteine zu entfernen wurden die Lysate mit 50 μl , entsprechend den Angaben des Herstellers vorbehandelter, Protein G-Agarose (Roche Diagnostics) für mindestens 2 h bei 4°C vorinkubiert und danach zentrifugiert ($734 \times g$, 3 min, 4°C). Dem Überstand wurden 5 μl des entsprechenden Antikörpers zugegeben und 3-4 h bei 4°C erneut auf einem Rollrad inkubiert. Zur Präzipitation der Protein-AK-Komplexe wurden nun wiederum 50 μl Protein G-Agarose zugegeben und für zusätzliche 2 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit je 1 ml RIPA-Puffer wurden die Proteine mit 100 mM Glycin, pH 2,7 eluiert bzw. direkt in SDS-Probenpuffer aufgenommen und aufgekocht.

RIPA-Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA,
1% (v/v) Nonidet P-40, 0,25% (w/v) Natriumdeoxycholat,
Proteaseinhibitoren: 1 mM PMSF, 10 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin,
10 $\mu\text{g/ml}$ Pepstatin

2.5.7 Test auf Zugänglichkeit von Cystein-Resten in Proteinen

Die Experimente zur Zugänglichkeit von einzelnen Cysteinen für Sulhydryl-Reagenzien wurden wie bereits beschrieben durchgeführt (Bogdanov *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002). Koloniematerial von je zwei voll bewachsenen Agarplatten verschiedener Bakterienstämme wurde mit einem sterilen Wattestäbchen abgenommen, in PBS resuspendiert und gewaschen. Alternativ verwendet wurden Flüssigkulturen, die bis zu einer $OD_{550} = 0,5-0,8$ gewachsen waren. Die Zellen wurden geerntet, das Pellet in PBS resuspendiert und ebenfalls gewaschen. Nach dem Waschschrift wurden pro Stamm zwei Aliquots einer $OD_{550} = 15$ in 500 μ l Cys-Puffer angesetzt. Zu einer Zellsuspension wurde das Blockierungsreagenz AMS (4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonsäure, Invitrogen) in einer Endkonzentration von 5 mM hinzugegeben, und die Zellen für 30 min bei 25°C inkubiert. Danach wurde das AMS durch Suspendieren und zweimaliges Waschen in 5 ml Cys-Puffer entfernt und das Zellpellet wiederum in 500 μ l Cys-Puffer aufgenommen. Zu der vorbehandelten und der zweiten, unbehandelten Zellsuspension wurde jetzt das Markierungsreagenz MPB (3-(N-maleimidylpropionyl) biocytin, Invitrogen) in einer Endkonzentration von 100 μ M (aus einer frisch angesetzten 20 mM Stocklösung in DMSO) gegeben, und die Ansätze für 5 min bei 25°C inkubiert. Die Biotinylierungsreaktion wurde dann mit β -Mercaptoethanol (in 20 mM Endkonzentration) abgestoppt und die Bakterienzellen wurden 2 x mit Cys-Puffer (+ 20 mM β -Mercaptoethanol) gewaschen und letztlich in 500 μ l RIPA-Puffer resuspendiert. Es folgte ein Zellaufschluß mittels Ultraschall und die markierten Proteine wurden mit den entsprechenden Antikörpern, wie in **Kapitel II.2.5.6** beschrieben, präzipitiert.

Cys-Puffer: 100mM Hepes (pH 7,5), 250mM Saccharose, 25mM $MgCl_2$,
 0,1mM KCl

III Ergebnisse

1. Untersuchungen zur Wechselwirkung der *cag*-PAI mit dem Chromosom

In diesem Versuchsteil sollte der Einfluß von Genen auf das Cag-Typ IV-Sekretionssystem untersucht werden, die genetisch außerhalb der *cag*-Pathogenitätsinsel liegen. Hierzu wurden zunächst isogene Mutanten in den entsprechenden Genen *hp496*, *hp511* und *hp513-hp519* hergestellt und dann sollte mittels verschiedener Assays der mögliche Effekt der Mutanten auf das Typ IV-Sekretionssystem und die Translokation von CagA untersucht werden. Die Gene im Bereich vor der *cag*-Pathogenitätsinsel zeichnen sich durch interessante Eigenschaften aus. So besitzt das Gen *hp511* typische Eigenschaften eines Lipoproteins (Tomb *et al.*, 1997) und findet sich in manchen Stämmen auf der Pathogenitätsinsel nah dem *cagA*-Gen (Blomstergren *et al.*, 2004; McGee *et al.*, 1999). Somit könnte eine Rolle als VirB7-homologes Protein des Cag-Sekretionsapparats vermutet werden. Außerdem wurde das Gen in einem Screen als Urease-modulierender Faktor entdeckt, was eine weitere Assoziierung mit Virulenzfaktoren belegt. Die Gene *hp496* und *hp513* wurden in einem genomweiten Screen auf Proteininteraktionen in *H. pylori* als Interaktionspartner von CagA bzw. Cag α identifiziert (Rain *et al.*, 2001). Die Interaktion zwischen CagA und HP496 konnte bereits biochemisch bestätigt werden (Terradot *et al.*, 2004) und weitere Untersuchungen könnten neue Einblicke in den Mechanismus der CagA-Translokation bringen. Die Gene *hp515* und *hp516* zeigen signifikante Ähnlichkeit zur HslVU Protease in *E. coli* (Tomb *et al.*, 1997). Durch ihre Ähnlichkeit zu Proteasomen wird diese Protease auch als bakterielles Proteasom beschrieben (Groll *et al.*, 2005). HslU gehört zur AAA+ Superfamilie (*ATPases associated with various cellular activities*), einer Klasse von chaperon-ähnlichen ATPasen, die mit dem Auf- und Abbau, sowie der Funktion von Proteinkomplexen assoziiert sind (Neuwald *et al.*, 1999). Für einige dieser ATP-abhängigen Proteasen können virulenz-assoziierte Eigenschaften beobachtet werden (Butler S.M. *et al.*, 2006). Das *hslV*-homologe Gen *hp515* gehört auch zu dieser Familie der Hitzeschockproteine und wird auch als HSP20 benannt. Durch seine Assoziation mit der Zelloberfläche von *H. pylori* und dem geringen Antikörpertiter im menschlichen Wirt, kann für HSP20 eine Rolle in der Adhäsion ähnlich dem HSP60 nicht ausgeschlossen werden (Du and Ho, 2003). Es könnte somit die Kolonisierung des Wirts durch die Bakterien unterstützen. Auch soll eine Interaktion mit dem Effektorprotein des Cag-Sekretionsapparats, CagA, beobachtet worden sein (Du *et al.*, unveröffentlicht). Ein weiteres interessantes Gen dieser Region vor der *cag*-Pathogenitätsinsel ist das Gen *hp517*, das bei der Genomsequenzierung des Stammes 26695 mit Ähnlichkeit zu Era (*E. coli* Ras-like protein) identifiziert wurde (Tomb *et al.*, 1997). Era ist ein kleines G-Protein in *E. coli*, das durch Ähnlichkeit zum Ras-Protein entdeckt wurde. Die kleinen GTPasen der Ras-Superfamilie fungieren als binäre molekulare Schalter, die intrazelluläre Signalnetzwerke kontrollieren. Ras-regulierte Signalwege überwachen Prozesse wie die Integrität des Aktinzytoskeletts, Zellproliferation und -differenzierung, die Adhäsion und Migration von Zellen, aber auch den Vesikeltransport (Karnoub and Weinberg, 2008). Obwohl viele GTP-bindende Homologe der eukaryontischen Ras-Superfamilie quer durch das Bakterienreich identifiziert wurden (Dong *et al.*, 2007), bleibt die Funktion dieser Proteine bisher unklar. Daher stellte sich die Frage, ob ein Ras-ähnliches Protein in Nähe der *cag*-PAI im *H. pylori* Genom einen weiteren Kandidaten für die ausgelösten zellulären Effekte bei einer Infektion mit *H. pylori* darstellt. Schließlich findet sich noch das Gen *hp519* in unmittelbarer Nähe zur *cag*-Pathogenitätsinsel. Es gehört zur Gruppe von Proteinen, die sogenannte Sell-ähnliche Sequenzwiederholungen

(SLR) besitzen (Ponting *et al.*, 1999, Schultz *et al.*, 1998). Obwohl SLR-Proteine verschiedene zelluläre Funktionen besitzen, scheinen sie doch alle als Adaptorproteine für den Aufbau membran-gebundener, makromolekularer Komplexe zu dienen (Mittl and Schneider-Brachert, 2007). Eine starke Konservierung der SLR-Motive von HP519 beim Vergleich verschiedener Stämme lässt darauf schließen, dass diese kritisch für die Proteinfunktion sind. Da die Beobachtung einer positiven Selektion oberflächenassoziiierter Aminosäuren in den *slr*-Genen auf eine Selektion hin zu einer veränderten Interaktion mit oder Erkennung durch kritische Komponenten des Immunsystems darstellt, ist es gerade im Falle von HP519 erstrebenswert, interagierende Wirtsproteine zu identifizieren und den Beitrag seiner Varianten auf diese Interaktionen und auf die Kolonisierung oder Virulenz zu identifizieren. Bei diesem Protein ist die allelische Diversität gegenüber den anderen *H. pylori* SLR-Proteinen am größten, was auf Unterschiede in den physiologischen Eigenschaften der Wirte und auf eine damit verbundene Selektion auf Veränderungen in den entsprechenden mikrobiellen (SLR-) Proteinen, hindeutet (Ogura *et al.*, 2007). Durch seine Ähnlichkeit zum humanen SellL-Protein, das durch Interaktionen mit anderen eukaryontischen Proteinen die Zellproliferation, Apoptose, die Immunantwort und den intrazellulären Transport bestimmt (Grant and Greenwald, 1996; Cattaneo *et al.*, 2004) erschien es sehr interessant, mögliche Rollen von HP519 auf die bei einer *H. pylori* Infektion ausgelösten Effekte auf die Wirtszellen zu untersuchen.

1.1 Herstellung von Deletionsmutanten der Gene *hp496* und *hp511*

Die Gene *hp496* und *hp511* wurden komplett deletiert. Das entsprechende Gen sollte dabei durch eine Chloramphenicol-Resistenzgenkassette ersetzt werden. Zunächst wurde der Bereich vor und nach dem entsprechenden Gen mittels PCR amplifiziert. Diese beiden DNA-Fragmente wurden dann mit der Resistenzgenkassette zwischen ihnen in einem geeigneten Vektor, beispielsweise pBluescript, ligiert. Dieser Vektor konnte dann in *H. pylori* transformiert werden und durch homologe Rekombination der Genbereiche auf dem Vektor und der chromosomalen Kopie wurde die Resistenzgenkassette anstelle des Gens in das Chromosom inseriert.

Für die Herstellung der Mutante $\Delta hp496$ im Stamm P12 wurde auf eine 2 kb-Genbank zurückgegriffen (W. Fischer *et al.*, unveröffentlicht), die bereits das Gen *hp496* und die Genbereiche davor und danach enthielt. Mit den Primern WS330 und WS331 wurde der Bereich vor und nach dem Gen *hp496* zusammen mit dem Vektor-Gerüst amplifiziert. Danach wurde eine Chloramphenicol-Resistenzgenkassette über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Sal*I, die durch die Primer eingebracht wurden, mit dem PCR-Produkt ligiert. Die Korrektheit erhaltener Klone wurde über Restriktionsanalyse festgestellt. Der so entstandene Vektor pSK6 enthielt nun ein etwa 1000 bp großes DNA-Fragment des Bereichs vor und ein etwa 550 bp großes Stück des Bereichs nach dem Gen *hp496* mit einer Chloramphenicol-Genkassette dazwischen (siehe **Abb. III.1.1A**).

Die Mutante im Gen *hp511* wurde im Stamm 26695 erzeugt. Dazu wurden etwa 500 bp große Bereiche vor und nach dem Gen *hp511* (V511, 460 bp; N511, 521 bp) mit den Primerpaaren WS274/WS275 und WS276/WS277 aus chromosomaler DNA durch PCR amplifiziert. Durch Ligation beider Fragmente mit einer Chloramphenicol-Resistenzgenkassette im Vektor pBluescript entstand der Vektor pSK3. **Abb. III.1.1B** zeigt eine Darstellung dieses Plasmids zur Deletion des Gens *hp0511*.

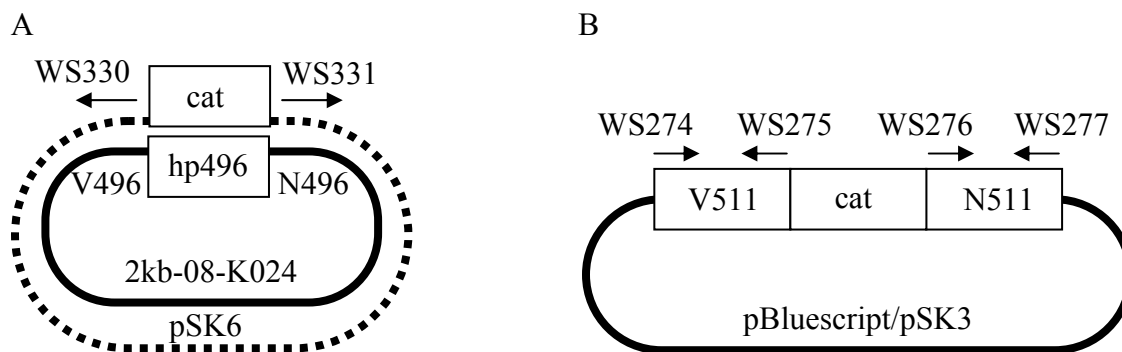


Abb. III.1.1.: Klonierungsstrategien zur Herstellung von Deletionsmutanten in *H. pylori*. (A) Herstellung der Mutante $\Delta hp496$ im Stamm P12. Ausgehend vom Plasmid 2kb-08-K24 (schwarze Linie) wurden die Genbereiche vor und nach dem Gen *hp496* (V496, N496) mit den Primern WS330/WS331 amplifiziert und mit einer *cat*-Resistenzgenkassette ligiert. Daraus entstand das Plasmid pSK6 (gestrichelte Linie). (B) Herstellung der Mutante $\Delta hp511$ im Stamm 26695. Die Genbereiche vor (V511) und nach (N511) dem Gen *hp511* wurden mit den oben angegebenen Primersätzen von chromosomaler DNA amplifiziert und mit einer *cat*-Resistenzgenkassette im Vektor pBluescript ligiert (pSK3).

1.2 Erzeugung von Mutanten in den Genen *hp513-hp519* durch Transposonmutagenese

Da die Herstellung von Deletionsmutanten wie in **Kapitel III.1.1** beschrieben für einzelne Gene sehr sinnvoll ist, so ist sie doch sehr aufwändig, wenn man mehrere Gene ausschalten und untersuchen möchte. Das jeweilige Amplifizieren der Genbereiche vor und nach dem entsprechenden Gen und die Ligation mit einer Resistenzgenkassette sind für mehrere Gene recht zeitaufwendig. Von daher wurde im Folgenden zum Ausschalten der Gene *hp513-hp519* im Stamm 26695 auf die Technik der Transposonmutagenese zurückgegriffen. Durch statistisch verteilte Transposoninsertionen in ein DNA-Fragment von Interesse können leicht Mutanten erzeugt werden, wenn das Transposon in ein Gen inseriert und es damit unterbricht. Zunächst sollte der gesamte Genbereich *hp513-hp519* amplifiziert und in den Vektor pMin2 kloniert werden. Allerdings war die Amplifikation des 7428 bp großen Genbereichs nicht erfolgreich, was vermutlich an der Länge des DNA-Fragments lag. Deshalb wurde das zu amplifizierende Stück in zwei sich überlappende Fragmente, 513/516 (4615 bp, Primer WS280/WS283) und 516/519 (4177 bp, Primer WS282/JP23), geteilt und die PCR erneut durchgeführt. Danach wurden die beiden Amplifikate in den Vektor pMin2 kloniert und die Transposonmutagenese durchgeführt. Es wurde wie in **Kapitel II.2.1.6** beschrieben vorgegangen. **Abb. III.1.2** veranschaulicht die beiden klonierten Fragmente des Genbereichs mit den erhaltenen Transposoninsertionen.

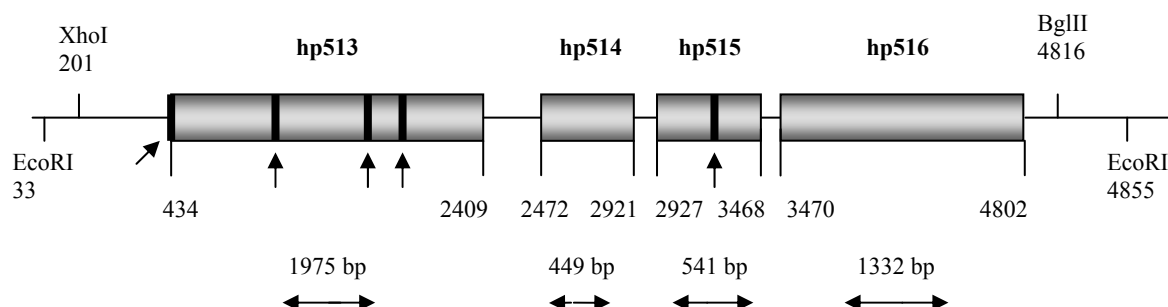
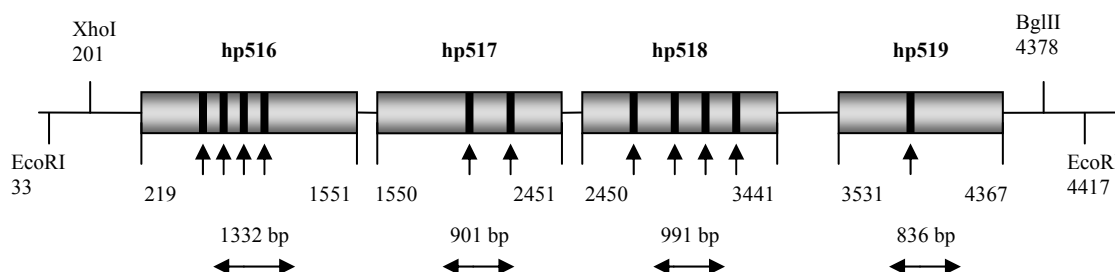
A**B**

Abb.III.1.2: Darstellung der beiden überlappenden Fragmente des Genbereichs *hp513-hp519*. (A) Fragment 513/516 mit Genen *hp513-hp516*. (B) Fragment 516/519 mit Genen *hp516-hp519*. Die erhaltenen Transposoninsertionen innerhalb der Gene sind durch Pfeile angedeutet. Die Zahlen geben jeweils Positionen innerhalb des pMin2-Vektors an bzw. die Länge der Gene.

Die genaue Lage der Transposoninsertionen wurde mittels Restriktionsanalyse ermittelt. Bei der Verteilung der Transposoninsertionen fällt auf, dass diese nicht rein statistisch über die Gene verteilt sind, sondern dass eine Präferenz für bestimmte Bereiche besteht. Dies zeigt sich besonders deutlich in der Konzentration der Insertionen in den Genen *hp513*, *hp516* und *hp518*, während die anderen Gene weniger Insertionen aufwiesen. Es wurden Klone mit Insertionen für alle zu untersuchenden Gene erhalten, außer für das Gen *hp514*, vermutlich wegen der Größe des Gens *hp513* von annähernd 2 kb und der bevorzugten Insertion des Transposons in den vorderen Teil des klonierten Bereichs.

Pro Gen wurde nun ein mutiertes Plasmid ausgesucht, welches im jeweiligen Gen eine Transposoninsertion möglichst weit am 5'-Ende aufwies, sodass durch einen möglichst frühen Abbruch bei der Translation des zu untersuchenden Gens keine funktionellen Proteinfragmente entstehen können. Die ausgewählten Plasmide wurden in den *H. pylori*-Stamm 26695 mittels natürlicher Transformation (siehe **Kapitel II.2.1.7**) bzw. Elektroporation (siehe **Kapitel II.2.1.8**) eingebracht.

Überprüfung der Korrektheit der Transformanten/Mutanten mittels PCR

Nach Transformation der Plasmide fand eine Deletion des gewünschten Gens durch homologe Rekombination statt. Das zugrunde liegende Prinzip wird durch **Abb. III.1.3** veranschaulicht.

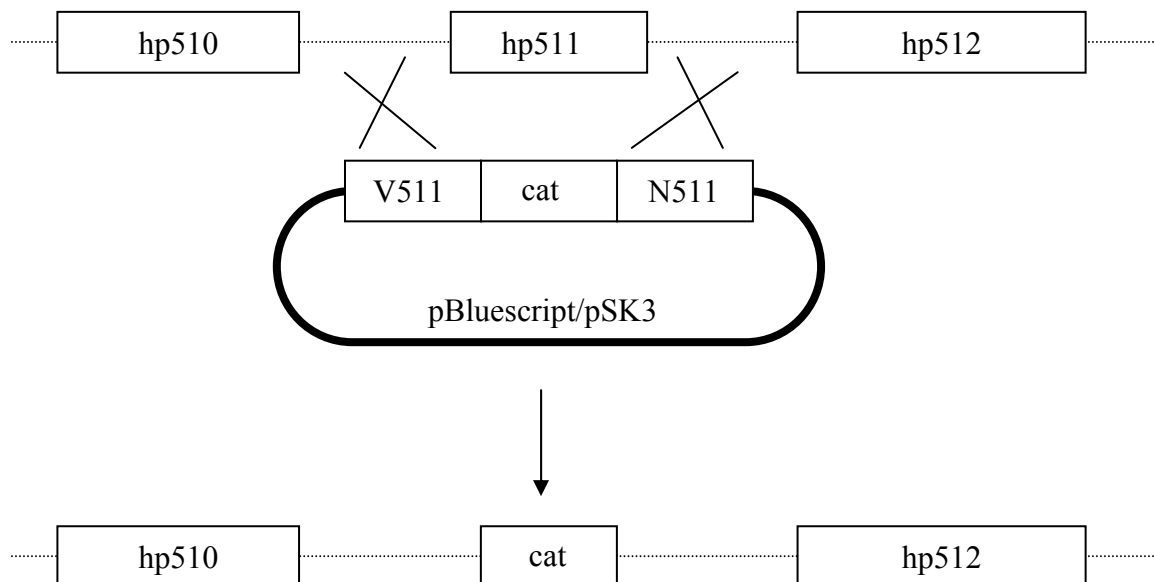


Abb.III.1.3: Darstellung des Prinzips der homologen Rekombination am Beispiel der Deletionsmutante Δ *hp511*. Nach Einbringen des Mutagenese-Vektors pSK3 in *H. pylori* lagert sich das Plasmid bei der Replikation mit den homologen DNA-Bereichen V511 bzw. N511 an die chromosomale intergenische Region *hp510-hp511* bzw. *hp511-hp512* an. Dabei kommt es zum Austausch der dazwischen liegenden DNA-Bereiche. In diesem Fall wird das Gen *hp511* durch eine *cat*-Resistenzgenkassette ersetzt.

Die Gene *hp496* und *hp511* wurde auf die in **Abb.III.1.3** dargestellte Art deletiert. Bei den Mutanten *hp513-hp519* wurde durch die Transposonmutagenese nicht das gesamte Gen durch die Resistenzgenkassette ersetzt, sondern es wurde das mit dem Transposon unterbrochene Gen ins Chromosom eingeführt.

Nach Transformation der Mutagenese-Vektoren wurde auf die nun eingeführte Chloramphenicol-Resistenzgenkassette selektioniert, erhaltene Klone wurden kultiviert und Gefrierkulturen angelegt. Die Korrektheit der Mutanten wurde mittels PCR überprüft. Es wurden verschiedene Primerpaare mit Bindestellen im Chromosom und/oder in der Resistenzgenkassette verwendet. Als Kontrollen dienten chromosomale DNA der Wildtypstämme P12 und 26695 bzw. $H_2O_{dest.}$. In nachfolgender Tabelle sind die für die einzelnen Mutanten durchgeführten PCR-Ansätze zusammengefasst. Daraus wird ersichtlich, dass für alle Mutanten positive Klone erhalten wurden. Eine detaillierte Beschreibung der Ergebnisse aus **Tab. III.1.4** und zugehörige Gelbilder der PCRs finden sich im Anhang (siehe **Abb.VIII.1-5**). Positive Klone der jeweiligen Mutanten konnten nun in verschiedenen Assays zur Untersuchung möglicher Effekte auf den Cag-Sekretionsapparat und die Translokation von CagA eingesetzt werden.

Tabelle III.1.4: PCR-Ansätze zur Überprüfung der Korrektheit der Mutanten im Genbereich *hp496-hp519*

| Mutante | Primer | Fragmentgröße [bp] | Getestete Klone | Positive Klone |
|----------------|----------------------|----------------------------------|----------------------------|---------------------------|
| $\Delta hp496$ | RH136/SK2 SK1/SK2 | 1555 | 4 | 4 |
| | | 2119 (Mutante) | 4 | 4 |
| | | 1644 (Wildtyp) | | |
| $\Delta hp511$ | WS275/WS277 | 1837 (Mutante) 1137 (Wildtyp) | 4 | 3 |
| $\Delta hp513$ | WS280/RH137 | 2562 | 2 | 2 |
| $\Delta hp515$ | HH48/WS283 | 1861 | 2 | 2 |
| | RH136/WS283 | 2471 | 2 | 2 |
| $\Delta hp516$ | HH48/WS283 | 982 | 2 | 2 |
| | RH136/WS283 | 1542 | 2 | 2 |
| $\Delta hp517$ | HH48/JP23 | 2695 | 2 | 2 |
| | RH136/JP23 | 3255 | 2 | 2 |
| $\Delta hp518$ | HH48/JP23 | 2111 | 2 | 2 |
| | RH136/JP23 | 2671 | 2 | 2 |
| $\Delta hp519$ | HH48/JP23 | 1011 | 2 | 2 |
| | RH136/JP23 | 1321 | 2 | 2 |
| | JP22/JP23 | 3386 (Mutante) | 2 | 2 |
| | | 1916 (Wildtyp) | 2 | 2 |

1.3 Effekte der mutierten Gene auf den Sekretionsapparat

Nach Verifizierung der Transposoninsertionen und erfolgreicher Erzeugung der Mutanten in den Genen von Interesse sollten nun mittels verschiedener Assays die möglichen Effekte auf den Sekretionsapparat und die Translokation von CagA untersucht werden.

1.3.1 Translokation von CagA

Infektion von AGS-Zellen

Die Untersuchung der Translokation von CagA erfolgte im Phosphotyrosin-Assay. Dazu wurden AGS-Zellen in 6-Well-Platten mit den verschiedenen *H. pylori*-Stämmen für 4 h mit einer MOI von 100 infiziert. Anschließend wurden die Infektionsansätze, wie unter **Kapitel II.2.3.4** beschrieben, aufbereitet. Die fertigen Proben wurden einer SDS-Gelelektrophorese unterzogen und das translozierte Effektorprotein CagA mittels Western Blot detektiert.

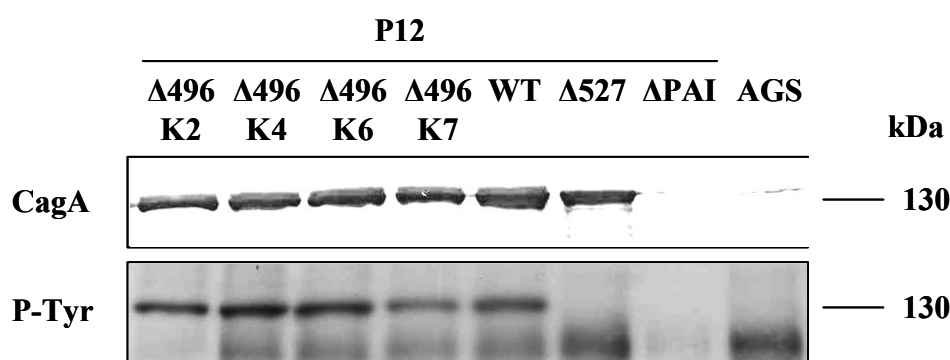


Abb.III.1.5: Infektion von AGS-Zellen mit *H.pylori* $\Delta hp496$ Mutanten. AGS-Zellen wurden mit verschiedenen Klonen (K2, K4, K6 und K7) der $\Delta hp496$ Mutante infiziert und die Translokation von CagA anhand seiner Tyrosinphosphorylierung bestimmt. Die Lysate der Infektionsansätze wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und der Western Blot mit α -CagA (AK257) bzw. α -P-Tyr entwickelt. Als Kontrolle dienten sowohl der P12 Wildtypstamm als auch P12 $\Delta 527$ und P12 ΔPAI sowie ein nicht-infizierter Ansatz mit AGS-Zellen.

Infektionsexperimente von AGS-Zellen mit verschiedenen positiven Klonen der $\Delta hp496$ Mutante zeigen, dass CagA in gleichem Maße von den Mutanten gebildet wird wie beim Wildtyp (CagA Western Blot, **Abb.III.1.5**). Darüber hinaus wird das Effektorprotein ebenfalls im selben Ausmaß transloziert wie beim Wildtyp (P-Tyr Western Blot, **Abb.III.1.5**). Es ist eine deutliche Bande im Phosphotyrosinblot erkennbar, die bei den beiden Kontrollmutanten, P12 $\Delta 527$ (bildet noch CagA, ist aber defekt in der Translokation), P12 ΔPAI (es fehlt die gesamte Pathogenitätsinsel) und der nicht infizierten AGS-Kontrolle fehlen. Somit lässt sich kein Unterschied bei der $\Delta hp496$ Mutante gegenüber dem Wildtyp bei der CagA-Bildung und Translokation feststellen.

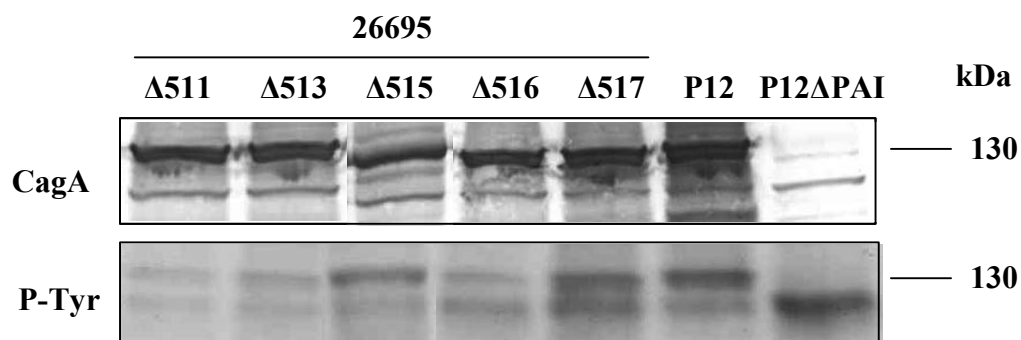


Abb.III.1.6.: Infektion von AGS Zellen mit verschiedenen *H. pylori* Mutanten. AGS-Zellen wurden mit den Mutanten $\Delta hp511$, $\Delta hp513$, $\Delta hp515$, $\Delta hp516$ und $\Delta hp517$ für 4 h mit einer MOI=100 infiziert. Die Lysate der Infektionsansätze wurden über SDS-Page aufgetrennt und der Western Blot mit α -CagA (AK257) bzw. α -P-Tyr (PY99) entwickelt. Als Kontrolle wurden ein P12-Wildtyp bzw. ein Stamm ohne Pathogenitätsinsel, P12 Δ PAI, verwendet.

In **Abb.III.1.6** sind die Ergebnisse von Infektionen von AGS-Zellen mit den Mutanten $\Delta hp511$, $\Delta hp513$, $\Delta hp515$, $\Delta hp516$ und $\Delta hp517$ dargestellt. Es zeigt sich, dass alle Mutanten sowohl untereinander als auch gegenüber dem Wildtypstamm unvermindert CagA produzieren und dieses auch transloziert wird. Die deutliche Bande im Phosphotyrosinblot weist auf das Vorhandensein eines intakten Sekretionssystems in allen Mutanten hin.

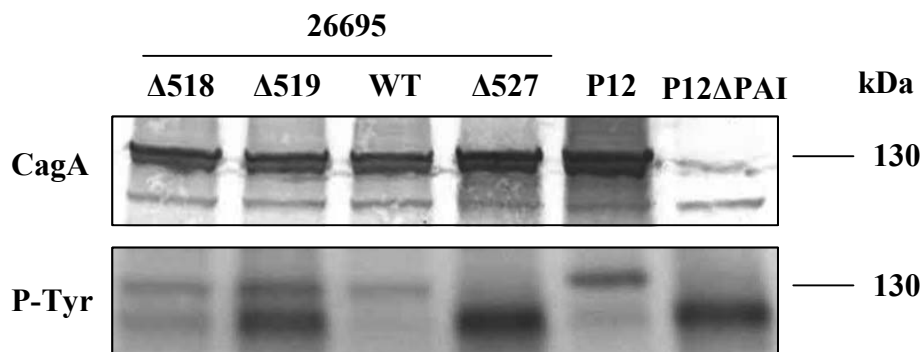


Abb.III.1.7: Infektion von AGS Zellen mit verschiedenen *H. pylori* Mutanten. AGS-Zellen wurden mit den Mutanten $\Delta hp518$ und $\Delta hp519$ für 4 h mit einer MOI=100 infiziert. Die Lysate der Infektionsansätze wurden über SDS-Page aufgetrennt und der Western Blot mit α -CagA (AK257) bzw. α -P-Tyr (PY99) entwickelt. Als Kontrolle wurden 26695 und P12-Wildtypstämme sowie 26695 $\Delta 527$ bzw. ein Stamm ohne Pathogenitätsinsel, P12 Δ PAI, verwendet.

Wie aus **Abb.III.1.7** ersichtlich wird, zeigen die beiden Mutanten $\Delta hp518$ und $\Delta hp519$ ebenso wie alle anderen getesteten Mutanten eine unverminderte CagA-Bildung. Auch die CagA-Translokation findet auf Wildtypniveau statt, wie der Phosphotyrosinblot deutlich zeigt. Auch hier lässt sich feststellen, dass die mutierten Gene keinerlei Einfluß auf die Bildung von CagA und seine Translokation in Wirtszellen zu scheinen haben.

Infektion von J774A.1-Zellen

Werden professionelle Phagozyten, wie z. B. Makrophagen, mit *Helicobacter pylori* infiziert, so findet ebenfalls eine Translokation von CagA statt. Anders als bei der Translokation in Epithelzellen wird CagA in Phagozyten prozessiert und es entsteht ein 35-45 kDa großes C-terminales Fragment, das die EPIYA-Motive trägt und tyrosinphosphoryliert wird (Odenbreit *et al.*, 2001). Somit lässt sich dieses Fragment sowohl im Western Blot gegen CagA als auch gegen die Tyrosinphosphorylierung nachweisen. Im Folgenden wurden Infektionsexperimente mit den verschiedenen Mutanten $\Delta hp496\text{-}\Delta hp519$ in J774A.1-Makrophagen durchgeführt. Es wurde der Einfluß der verschiedenen Mutanten auf die Translokation von CagA, die Prozessierung und Tyrosinphosphorylierung in diesem Zelltyp untersucht.

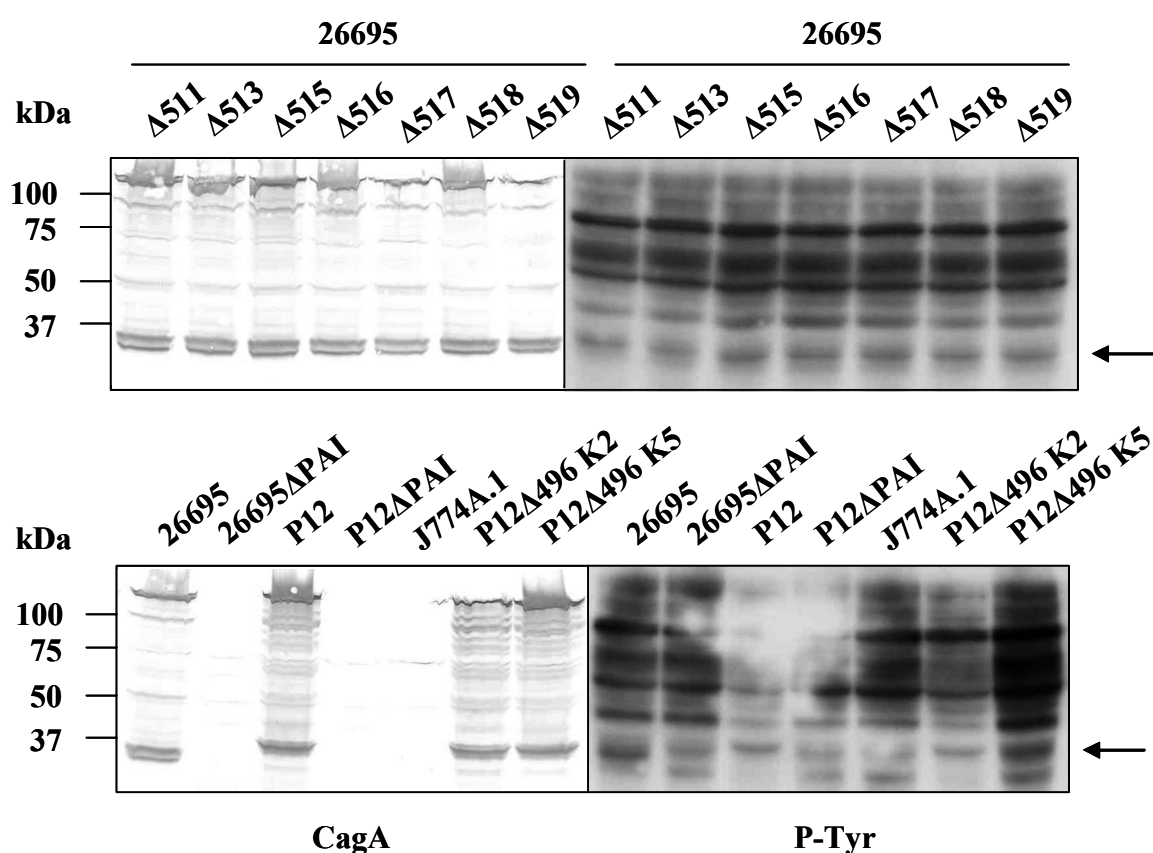


Abb.III.1.8.: Infektion von J774A.1-Zellen mit verschiedenen *H. pylori*-Stämmen. Die Zellen wurden für 4h mit einer MOI=100 infiziert. Die Lysate der Infektionsansätze wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und der Western Blot mit α -CagA (AK257) bzw. α -P-Tyr (PY99) entwickelt. Als Kontrolle dienten Ansätze mit den Wildtypstämmen 26695 und P12, den jeweiligen Δ PAI-Mutanten der Wildtypstämme sowie ein Ansatz mit nicht-infizierten J774A.1-Makrophagen. Die mit Pfeil gekennzeichneten Banden zeigen exemplarisch das 35 kDa-Abbaufragment von CagA (CagA-Blot) bzw. seine Tyrosinphosphorylierung (P-Tyr-Blot) bei Wildtypinfektionen bzw. Infektionen mit den Mutantenstämmen.

Die Infektionsexperimente mit den verschiedenen Mutanten in J774A.1 Makrophagen zeigen, dass auch CagA in diesen Stämmen transloziert und prozessiert wird. Es finden sich auch keine Unterschiede im Prozessierungsmuster gegenüber dem Wildtyp (Abb.III.1.8).

1.3.2 Auslösung des Hummingbird-Phänotyps

Bei einer mehrstündigen Infektion von AGS-Zellen mit *H. pylori* zeigt sich, dass die Zellen lange Zytoskelett-Ausläufer bilden, was als *hummingbird*-Phänotyp bezeichnet wird. Dieser stellt eine morphologische Veränderung der Zellen dar, die auch bei einer Behandlung mit dem Wachstumsfaktor HGF (*hepatocyte growth factor*) beobachtet werden kann. Dieser Phänotyp ist durch dramatische Zell-Elongation charakterisiert und findet nur bei Infektion mit *cag*⁺, nicht aber *cag*⁻ *H. pylori*-Stämmen statt (Segal 1997; Segal *et al.*, 1999). Zusätzlich löst sich der anfangs enge Zellverband des Zellmonolayers auf, es kommt zu erhöhter Zellmotilität, was als *scattering*-Phänotyp bezeichnet wird (Segal *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 2005). Beide Phänotypen sind abhängig von der Translokation des Effektormoleküls CagA und einem intakten Typ IV-Sekretionssystem. Im Weiteren sollte der Effekt der verschiedenen Mutanten $\Delta hp496$ – $\Delta hp519$ auf die Auslösung des *hummingbird*-Phänotyps untersucht werden. Dazu wurden AGS-Zellen für 4 h mit einer MOI = 100 mit den verschiedenen *H. pylori*-Stämmen infiziert. Danach wurde die Auslösung des Phänotyps mikroskopisch untersucht und mittels einer Digitalkamera dokumentiert.

$\Delta hp496$ - Mutante

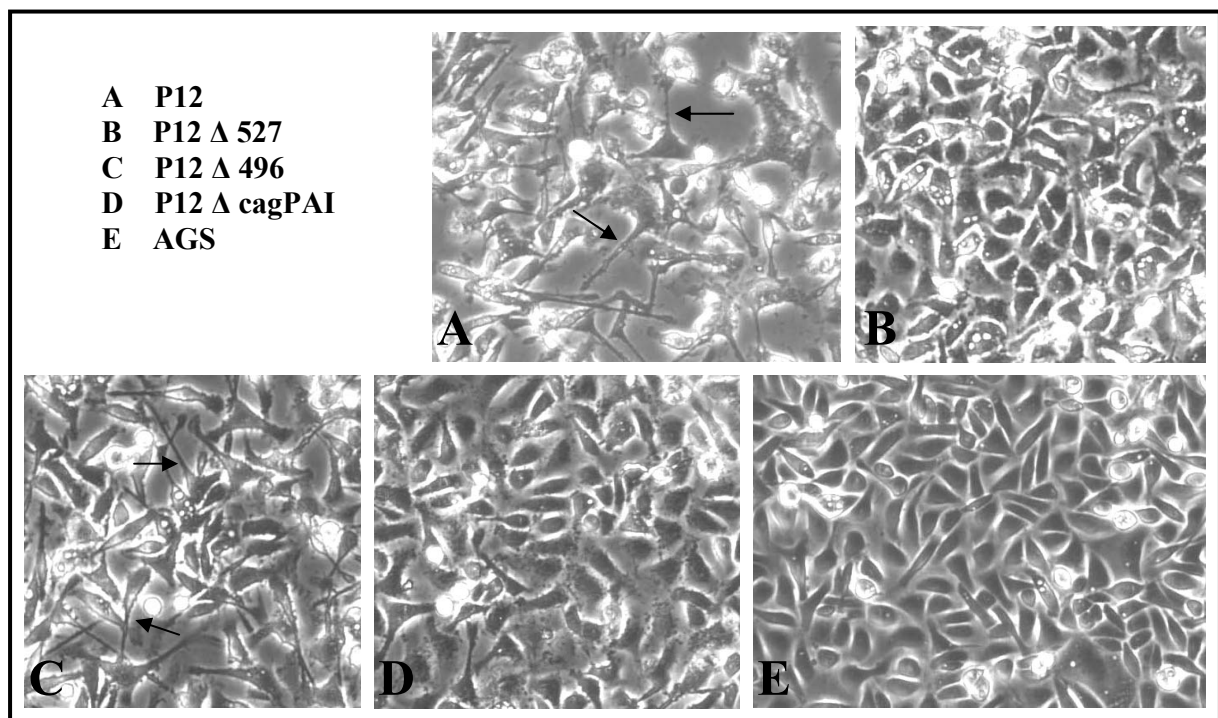


Abb.III.1.9: Infektionsexperimente von AGS-Zellen mit (A) P12 Wildtyp, (B) P12Δ527, (C) P12Δ496, (D) P12ΔPAI, (E) nicht infiziert. Die $\Delta hp496$ -Mutante löst den *hummingbird*-Phänotyp wie der P12-Wildtyp aus. Die schwarzen Pfeile zeigen die langen, für diesen Phänotyp charakteristischen Zytoskelettausläufer der infizierten Zellen.

Aus **Abb.III.1.9** wird ersichtlich, dass die $\Delta hp496$ -Mutante in gleichem Maße den *hummingbird*-Phänotyp auslöst wie der P12 Wildtyp-Stamm. Gegenüber den Kontrollinfektionen mit einer P12 $\Delta 527$ - und einer P12 ΔPAI -Mutante, die den Phänotyp aufgrund fehlender CagA-Translokation nicht auslösen, und dem nicht-infizierten Kontrollansatz sieht man bei der $\Delta hp496$ -Mutante deutlich den aufgelösten Zellverband und die elongierten Zellen, die lange Zytoskelettausläufer bilden (schwarze Pfeile). Diese mikroskopischen Ergebnisse bestätigen die Daten aus **Abb.III.1.5**, die eine deutliche Translokation von CagA in der $\Delta hp496$ -Mutante zeigen.

Mutanten $\Delta hp511$ - $\Delta hp519$

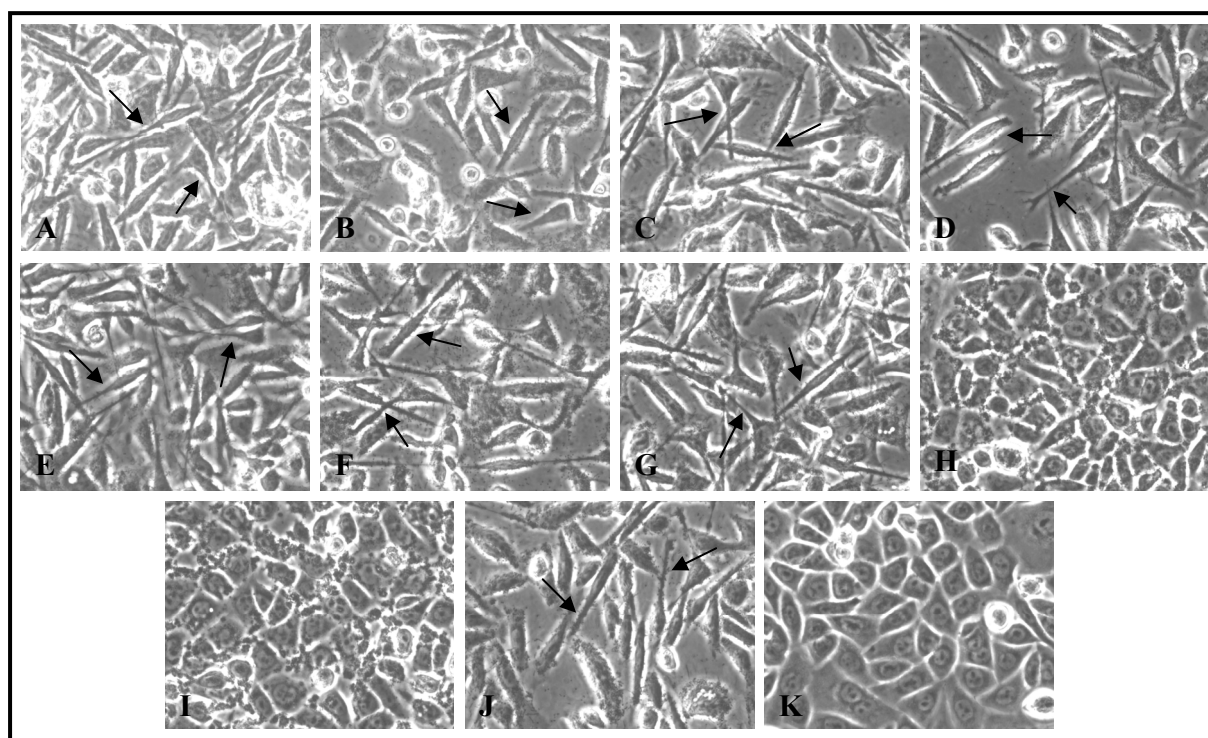


Abb.III.1.10: Infektionsexperimente von AGS-Zellen mit (A) 26695 $\Delta 511$, (B) 26695 $\Delta 513$, (C) 26695 $\Delta 515$, (D) 26695 $\Delta 516$, (E) 26695 $\Delta 517$, (F) 26695 $\Delta 518$, (G) 26695 $\Delta 519$, (H) 26695 $\Delta 527$, (I) 26695 ΔPAI , (J) 26695 wt, (K) nicht infiziert. Alle getesteten Mutanten zeigen eine deutliche Ausprägung des *hummingbird*-Phänotyps wie der Wildtypstamm. Die schwarzen Pfeile markieren die deutlich elongierten Zellen mit Zytoskelettausläufern nach vierstündiger Infektion mit MOI = 100.

Auch bei den Mutanten 26695 $\Delta 511$ -26695 $\Delta 519$ (**Abb.III.1.10A-G**) zeigt sich eine Ausbildung des *hummingbird*-Phänotyps bei Infektionsexperimenten mit AGS-Zellen. Die mit schwarzen Pfeilen markierten Ausläufer der elongierten Zellen und der aufgelöste Zellverband sind deutlich wie bei der Wildtyp-Infektion sichtbar (**Abb.III.1.10J**). Im Unterschied dazu ist bei den Stämmen 26695 $\Delta 527$ (**Abb.III.1.10H**), der zwar CagA noch bildet, aber ein defektes Sekretionssystem besitzt, und 26695 ΔPAI (**Abb.III.1.10I**), dem die Pathogenitätsinsel fehlt, der Zellverband noch intakt wie bei der nicht-infizierten Kontrolle (**Abb.III.1.10K**). Daher scheint die Auslösung des Phänotyps durch keines der mutierten Gene beeinflusst zu sein. Auch hier unterstützen die mikroskopischen Daten die bereits in **Abb.III.1.6 und 1.7** untersuchte Translokation von CagA.

1.3.3 IL-8 Induktion

Zusätzlich zur Auslösung des *hummingbird*- und *scattering*-Phänotyps findet eine Induktion des Chemokins IL-8 bei AGS-Zellen als Antwort auf eine Infektion mit *H. pylori* statt. Dieses wird in den Kulturüberstand abgegeben und kann mittels Sandwich-ELISA quantitativ gemessen werden. Im Folgenden wurde die Induktion von IL-8 bei Infektion mit den verschiedenen *H. pylori*-Mutanten untersucht.

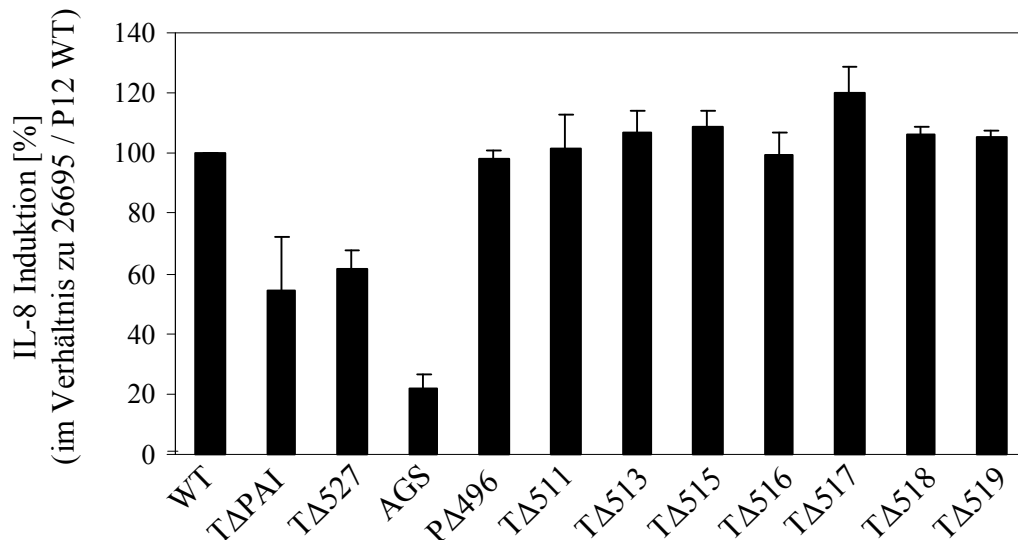


Abb.III.1.11: IL-8- Induktion in AGS-Zellen bei Infektion mit verschiedenen *H. pylori*-Stämmen. Die Zellen wurden für 4 h mit dem jeweiligen Bakterienstamm (MOI = 100) infiziert, danach wurde ein Aliquot des Kulturüberstandes entnommen und die Menge an gebildetem IL-8 mittels Sandwich-ELISA gemessen. In der Grafik sind die prozentualen Werte, bezogen auf die Infektion mit dem jeweiligen Wildtyp (als 100% gesetzt), der einzelnen Mutanten angegeben. T steht für 26695, P für P12.

Abb.III.1.11 stellt grafisch die IL-8 Induktion bei AGS Zellen dar, die mit verschiedenen Mutanten in den Genen *hp496*–*hp519* infiziert wurden. Aufgetragen sind die jeweiligen prozentualen Anteile bezogen auf die Induktion bei einer Wildtyp-Infektion (gesetzt als 100%). Es zeigt sich, dass bei allen getesteten Mutanten die Induktion von IL-8 ebenfalls auf Wildtypniveau stattfindet. Keines der mutierten Gene scheint eine verminderte IL-8 Sekretion zu Folge zu haben, wie dies bei den Kontrollinfektionen mit den Stämmen 26695ΔPAI und 26695Δ527 der Fall ist. Auch eine gesteigerte IL-8-Induktion findet sich ebenfalls bei keiner der Mutanten. Festzustellen bleibt also, dass auch die IL-8 Induktion die bisherigen Ergebnisse der CagA-Translokation (**Abb.III.1.5-1.7**) und der Auslösung des *hummingbird*-Phänotyps (**Abb.III.1.9 und 1.10**) unterstützt. Da fast ausschließlich ein intaktes Typ IV-Sekretionssystem für die beobachtete IL-8 Induktion verantwortlich ist, weisen die Mutanten offensichtlich keinen Defekt darin auf. Dadurch wird CagA weiterhin wie im Wildtyp transloziert, was u.a. zur Auslösung des *hummingbird*-Phänotyps führt. Da in keiner der untersuchten Mutanten ein Unterschied in all diesen Effekten zum Wildtyp beobachtet werden konnte, scheinen diese Gene keinen sichtbaren Einfluß auf die Translokation von CagA und die Funktionalität des Cag-Typ IV-Sekretionssystem zu haben.

2. Charakterisierung des Aufbaus des Cag-Typ IV-Sekretionssystems von *H. pylori*

2.1 Sequenzanalyse essentieller und akzessorischer Apparatskomponenten zur Sekundärstruktur- und Topologievorhersage

Insgesamt sind 18 Gene der *cag*-Pathogenitätsinsel essentiell für die Induktion der IL-8 Antwort in Epithelzellen und die Translokation und anschließende Tyrosinphosphorylierung des CagA Proteins (Fischer *et al.*, 2001b). Einige der Genprodukte zeigen Sequenzähnlichkeiten zu den Komponenten des prototypischen *A. tumefaciens* VirB Typ IV-Sekretionssystems (Akopyants *et al.*, 1998; Censini *et al.*, 1996), aber für die Mehrheit der Cag-Proteine sind keine Informationen über ihre Lokalisierung und mögliche Funktionen verfügbar. Daher sollten zunächst die Aminosäuresequenzen hinsichtlich charakteristischer Eigenschaften von Membranproteinen untersucht werden. Entsprechend früherer Daten (Fischer *et al.*, 2001b) wurden die Produkte der essentiellen Gene *cagδ* (*hp522*), *cagγ* (*hp523*), *cagα* (*hp525*), *cagY* (*hp527*), *cagX* (*hp528*), *cagW* (*hp529*), *cagV* (*hp530*), *cagU* (*hp531*), *cagT* (*hp532*), *cagM* (*hp537*), *cagL* (*hp539*), *cagH* (*hp541*), *cagE* (*hp544*) und *cagC* (*hp546*) und die Genprodukte der unterstützenden Sekretionsapparatskomponenten *cagN* (*hp538*) und *cagD* (*hp545*) und das mögliche Kopplungsprotein Cagβ (HP524) in die Sequenzanalyse eingeschlossen. Es fällt auf, dass selbst die Genprodukte mit einer signifikanten Homologie zu den VirB/D4-Proteinen (HP524, HP525, HP527, HP528, HP544) zum Teil auch deutliche Unterschiede aufweisen (**Abb.III.2.1**). Beispielsweise hat das HP527-Protein eine Homologie zu VirB10 in seinem C-terminalen Bereich, aber der weitaus größere N-terminale Teil ist überhaupt nicht ähnlich zu VirB10, und das gesamte Genprodukt ist mit vorhergesagten 220 kDa auch erheblich größer als VirB10 mit ca. 42 kDa. Auch das HP544-Protein ist mit einem vorhergesagten Molekulargewicht von etwa 112 kDa wesentlich größer als VirB4 und seine Homologen, die üblicherweise eine Größe von knapp 90 kDa aufweisen. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die auf der *cag*-Pathogenitätsinsel kodierten VirB-Homologen möglicherweise noch zusätzliche Funktionen wahrnehmen (W. Fischer, 2004). Sogar in den homologen Regionen sind die Sequenzähnlichkeiten oft nicht sehr ausgeprägt. Die paarweisen Identitätswerte liegen entsprechend bei 22% (für VirB10 vs. CagY), 28% (für VirB9 vs. CagX), 30% (für VirB4 vs. CagE), 33% (VirD4 vs. Cagβ) und 38% (VirB11 vs. Cagα). Darüber hinaus lässt sich auch über die Funktion der für die Typ IV-Sekretion notwendigen Komponenten ohne signifikante Homologie wenig aussagen. Um eine erste Vorstellung über mögliche Funktionen zu bekommen, wurde eine ausgedehnte Analyse aller Aminosäuresequenzen der Cag-Proteine durchgeführt.

N-terminale, Sec-abhängige Signalsequenzen wurden bereits schon früher für Cagδ, CagX, CagW, CagT, CagM, CagN, CagL, und CagD (Tomb *et al.*, 1997) vorhergesagt. Die hier benutzten SignalP- und PSORT-Algorithmen sagen auch für das CagC Protein eine lange Signalsequenz von 29-36 Aminosäuren voraus (**Abb.III.2.1**). Die Signalsequenz von CagT ist eine typische bakterielle Lipoprotein-Signalsequenz.

Potentielle Transmembranhelizes, die die Proteine in der Zytoplasmamembran verankern, wurden für CagY, CagV (Buhrdorf *et al.*, 2003) und CagH als bitopische Membranproteine, sowie für Cagβ, CagW, CagU, CagE und CagC als polytopische Membranproteine (**Abb.III.2.1**) vorhergesagt. Ausgehend von der „positive-inside“-Regel (von Heijne, 1995) verbleiben die N-Termini von CagY, CagV und CagE im Zytoplasma, während die Proteine CagW und CagC, nach der Prozessierung ihrer N-terminalen Signalsequenzen, sowie Cagβ,

CagU und CagH, ihren N-Terminus im Periplasma lokalisiert vorausgesagt haben. Das TMPred-Programm sagt eine zweite Transmembranregion für CagY voraus (AS 1799-1815), allerdings mit niedrigerer Wahrscheinlichkeit als die mögliche Helix bei AS 344-364 (1090 Punkte gegenüber 2484), wohingegen das TMHMM-Programm gar keine zweite Transmembranregion vorhersagte. Von daher wird eine bitopische Topologie der inneren Membran bei CagY angenommen, wobei der C-Terminus des Proteins im periplasmatischen Raum lokalisiert ist (**Abb III.2.1**).

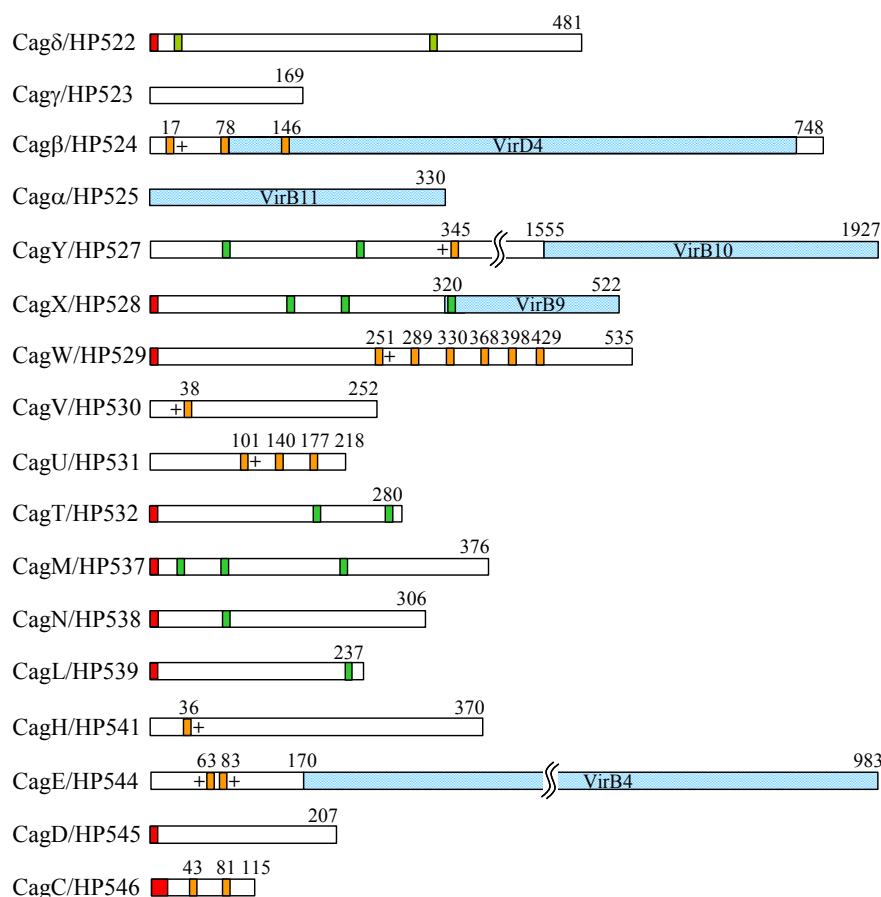


Abb.III.2.1: Untersuchungen zur Vorhersage der Topologie der Komponenten des Cag-Typ IV-Sekretionssystems. Graphische Darstellung möglicher membran-durchspannender Abschnitte und homologer Regionen von essentiellen und akzessorischen Komponenten des Cag-Sekretionsapparats. Die Proteine sind mit der Anzahl ihrer Aminosäuren, abgeleitet von der veröffentlichten Genomsequenz des Stammes 26695 (Tomb *et al.*, 1997), als Balken dargestellt. Die Bereiche mit Ähnlichkeit zu den entsprechenden *A. tumefaciens* VirB-Proteinen sind in blau dargestellt. Mögliche Transmembranhelizes, die mit den PHDhtm- oder TMPred-Algorithmen vorhergesagt wurden, sind als orange Boxen mit der Position der ersten Aminosäure der Transmembrandomäne darüber gekennzeichnet. Die roten Boxen geben N-terminale, Sec-abhängige, Signalsequenzen an. Ein Überschuss an positiv-geladenen Aminosäuren, der eine zytoplasmatische Orientierung der Transmembranhelix nach der „positive-inside“-Regel (von Heijne, 1995) vorhersagt, ist durch ein Pluszeichen angegeben. Durch den COILS-Algorithmus vorhergesagte coiled-coil-Regionen sind in grünen Boxen eingezeichnet.

2.2 Identifizierung weiterer VirB-ähnlicher Komponenten im Cag-System

Da die Sequenzähnlichkeiten der Komponenten des Cag-Typ IV-Sekretionssystems zu den VirB-Proteinen generell recht schwach sind und oftmals nicht bedeutende Teile der Proteine miteinschließen, stellte sich die Frage, ob zusätzliche, VirB-ähnliche Funktionen, auf der *cag*-Pathogenitätsinsel kodiert sein könnten. Solche Funktionen wurden beispielsweise für CagY vorgeschlagen, das gemeinsame Sequenzmotive zur VirB1-Familie aufweist und eine entsprechende Aktivität einer lytischen Transglykosylase besitzt (Höppner *et al.*, 2004; Zahrl *et al.*, 2005).

Ebenfalls weist CagC schwache Sequenzähnlichkeit zu VirB2 auf und ist teilweise auf der *H. pylori* Oberfläche exponiert (Andrzejewska *et al.*, 2006; Kalkum *et al.*, 2002).

Die vorhergesagten Transmembranregionen von CagC sind auch typisch für VirB2-ähnliche Piline und eine nähere Untersuchung der CagC-Aminosäuresequenz offenbart das Vorhandensein von schwach konservierten Motiven (**Abb.III.2.2A**). Im Fall von VirB2 und dem VirB2-ähnlichen Protein TrbC des Plasmid RP4-Konjugationssystems dienen diese Motive dazu, eine intramolekulare Zyklisierungsreaktion auszuführen, während der ein C-terminales Peptid abgespalten wird (Eisenbrandt *et al.*, 1999; Kalkum *et al.*, 2002). Polyklonale Antiseren wurden gegen zwei Peptide (CagC₁ und CagC₂) hergestellt (**Abb.III.2.2A**) und gegen bakterielle Zelllysate im Immunoblot getestet (**Abb.III.2.2B**). Beide Antiseren erkannten ein Protein mit der scheinbaren Größe von 8-9 kDa, was konsistent ist mit dem Vorhandensein einer gereiften Form des Proteins, dem die N-terminale Signalsequenz fehlt. Die Tatsache, dass der α -CagC₂-Antikörper, der gegen ein Peptid bestehend aus den letzten zehn C-terminalen Aminosäuren gerichtet ist, dasselbe Produkt erkennt wie der α -CagC₁-Antikörper, der ein internes Epitop von CagC erkennt (**Abb.III.2.2B**), legt nahe, dass CagC nicht Gegenstand einer Prozessierung ähnlich der von TrbC oder VirB2 ist, obwohl dies keine intramolekulare Zyklisierung ausschließt.

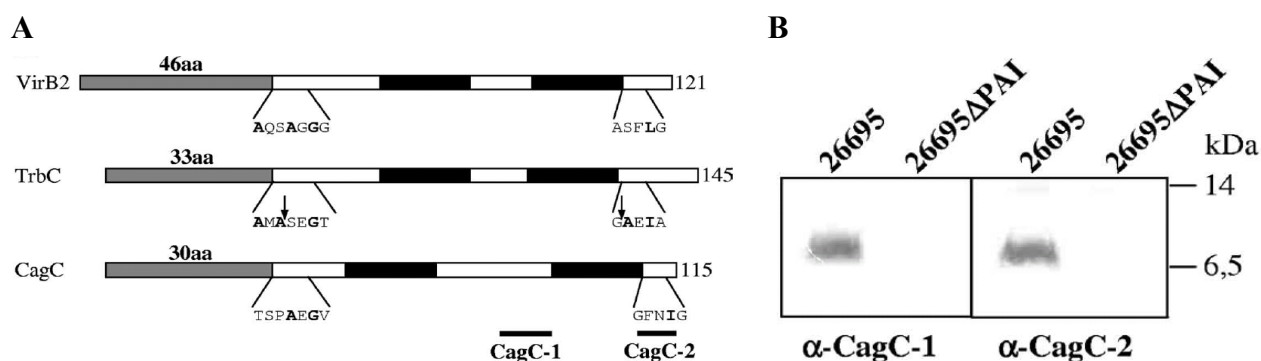


Abb.III.2.2: Sequenzanalyse und Charakterisierung des CagC-Proteins. (A) VirB2 und VirB2-ähnliche Proteine wie TrbC (auf Plasmid RP4) zeichnen sich durch ungewöhnlich lange N-terminale Signalsequenzen (dunkelgraue Balken mit entsprechender Anzahl an Aminosäuren darüber angegeben) und dem Vorhandensein zweier Transmembranhelizes aus (schwarze Balken). Schwach konservierte Bereiche wurden an der Schnittstelle der Signalpeptidase und einer C-terminalen Prozessierungsstelle (durch Pfeile im TrbC Protein angegeben), die zur Protein-Zyklisierung dient, identifiziert. Eine ähnliche Anordnung von Transmembrandomänen und schwach konservierten Motiven finden sich ebenfalls im CagC-Protein. Die schwarzen Balken unterhalb des CagC-Proteins geben Regionen an, aus denen Peptide zur Gewinnung von Antiseren abgeleitet wurden. (B) Immunoblot, der die Produktion von CagC im Wildtypstamm 26695 im Vergleich zur Δ PAI Mutante, der die *cag*-Pathogenitätsinsel fehlt, zeigt. Zwei verschiedene Antiseren, die ein internes und ein C-terminales Peptid von CagC erkennen, wurden benutzt. aa, Aminosäuren.

Zunächst wurde angenommen, dass das *cagD*-Gen ein potentiell *virB3*-ähnliches Gen sei, da die Anordnung von Genen mit Sequenzähnlichkeiten zu *virB2*, *virB3* und *virB4* in vielen Systemen konserviert ist (Schröder and Lanka, 2005). VirB3-ähnliche Proteine sind essentielle Komponenten von Typ IV-Sekretionssystemen, obwohl ihre genaue Funktion noch unklar ist (Christie *et al.*, 2005). Die VirB3-Aminosäuresequenz enthält zwei hydrophobe Regionen, und auch schwach konservierte Motive kennzeichnen VirB3-ähnliche Proteine (**Abb.III.2.3**). Solch eine Anordnung findet sich nicht im CagD Protein, das darüber hinaus nicht essentiell für den Cag-Typ IV-Sekretionsapparat ist (Fischer *et al.*, 2001b). Bei genauerer Betrachtung der Aminosäuresequenz von CagE konnten zu VirB3 ähnliche hydrophobe Regionen und schwach konservierte Motive in den 150 N-terminalen Aminosäuren identifiziert werden, einer Region, die nicht verwandt mit VirB4-ähnlichen Proteinen ist (**Abb.III.2.1**, **Abb.III.2.3**). Diese Ähnlichkeit bezieht sich besonders auf das CmgB3/B4 Protein von Konjugationssystemen verschiedener *Campylobacter* Spezies, wo schon früher Genfusionen zwischen *virB3*- und *virB4*-ähnlichen Genen gefunden wurden (Batchelor *et al.*, 2004). Dies deutet darauf hin, dass CagE eine Fusion einer VirB3-ähnlichen und einer VirB4-ähnlichen Komponente darstellen könnte (**Abb.III.2.3**).

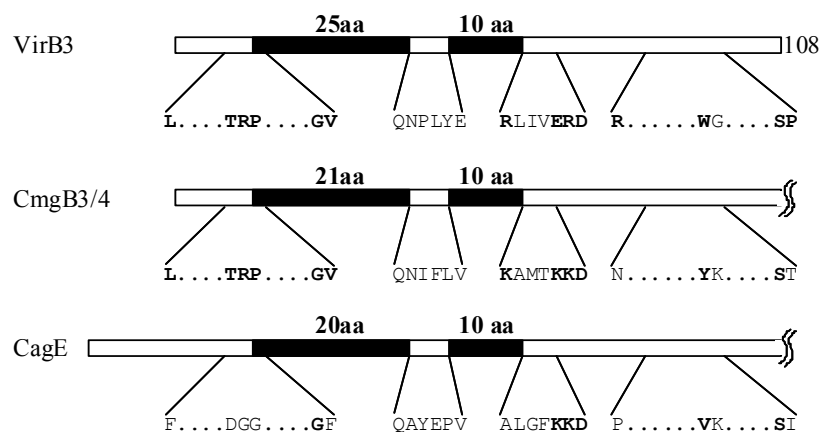


Abb.III.2.3: Vergleich des *A. tumefaciens* VirB3-Proteins mit den N-terminalen Teilen des *C. jejuni* CmgB3/B4 Proteins und CagE. Zwei hydrophobe Regionen von etwa 20-25 und 10 Aminosäuren sind in jedem der Proteine vorhanden (genauso wie in allen VirB3-ähnlichen Proteinen). Gezeigt ist die Lokalisierung der konservierten Motive zwischen allen VirB3-ähnlichen Proteinen mit den hochkonservierten Aminosäureresten in Fett gedruckt. Die dargestellten Regionen von CmgB3/B4 und CagE weisen eine Sequenzidentität von 24% auf.

Die VirB6-Proteinfamilie weist nur eine begrenzte Sequenzähnlichkeit auf (Lawley *et al.*, 2003). Allerdings scheinen Komponenten mit 5-7 vorhergesagten Transmembranhelizes für alle Typ IV-Sekretionssysteme notwendig zu sein. Das TrbL Protein des Plasmids RP4, beispielsweise, enthält sechs vorhergesagte Transmembranhelizes mit einer ähnlichen Anordnung wie bei VirB6 (Grahn *et al.*, 2000). Es zeigt aber keine Ähnlichkeit auf dem primären Sequenzlevel. Dementsprechend stellt CagW den besten Kandidaten unter den auf der *cag*-PAI kodierten Proteinen als funktionelles VirB6-Analogon dar (**Abb.III.2.1**). Interessanterweise ist die Aminosäuresequenz vor der letzten vorhergesagten Transmembranhelix von CagW (422-SMKNILIWFNNLFI-436) ähnlich zu einem konservierten Motiv der VirB6-Familie (Judd *et al.*, 2005a), bei der das Motiv in einer zytoplasmatischen Schleife vor Transmembranhelix 4 lokalisiert ist und ebenfalls einen essentiellen Tryptophanrest enthält. Weiterhin ist die letzte mutmaßliche Transmembranhelix

in CagW reich an Leucin und besitzt einen Valin/Leucin/Isoleucin Gehalt von 61%, was als wichtig für die Funktion von VirB6 erachtet wird (Judd *et al.*, 2005b).

Zusammenfassend legen diese Daten nahe, dass das Cag-System analoge Komponenten zu allen VirB Proteinen, außer zu VirB5, besitzt.

2.3 Zelluläre Lokalisierung essentieller Apparatskomponenten

Um experimentelle Nachweise für die vorhergesagte Lokalisation der Komponenten des Cag-Sekretionsapparats zu bekommen, sollte untersucht werden, ob verschiedene Cag-Proteine mit den bakteriellen Membranen assoziiert sind. Dazu wurden *H. pylori* Zellen in lösliche und Membranfraktionen separiert. Eine anschließende Immunoblotanalyse wurde mit Antikörpern gegen insgesamt sieben Cag-Proteine durchgeführt: Cag α , CagY, CagX, CagT, CagM, CagL und CagC.

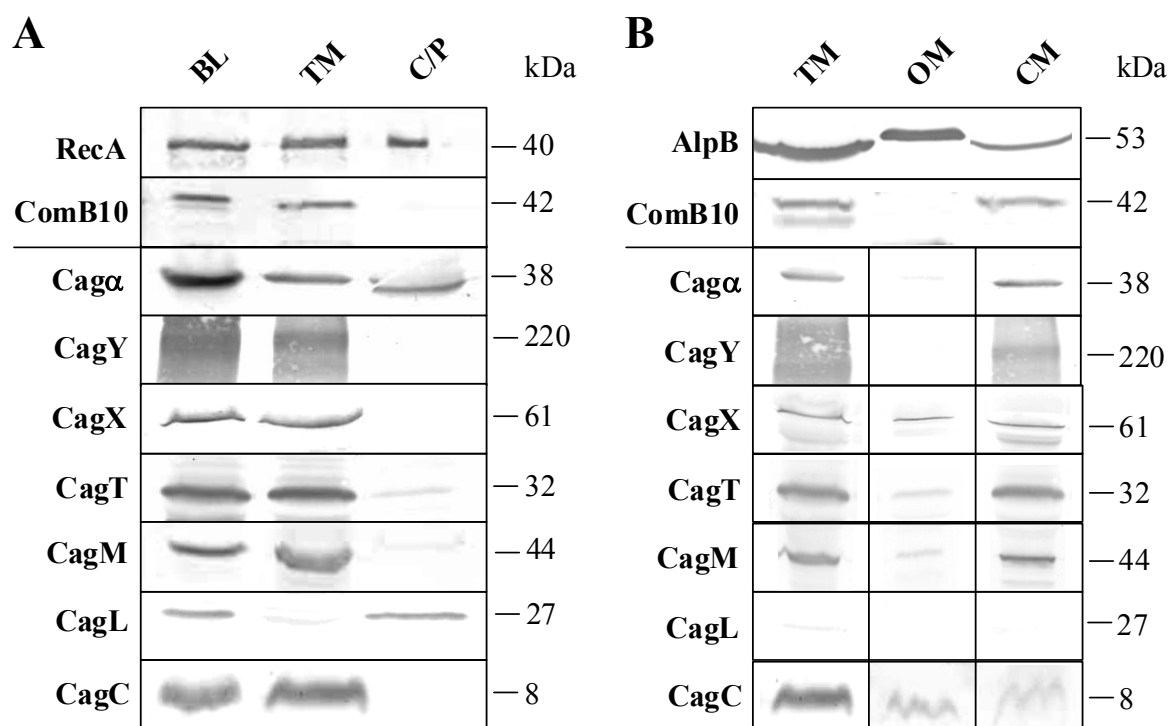


Abb.III.2.4: Immunoblotanalyse der Lokalisierung von Proteinen des Cag-Sekretionsapparats. (A) *H. pylori* bakterielle Zelllysate (BL) wurden durch Ultrazentrifugation in eine Gesamtmembranfraktion (TM) und eine lösliche Fraktion (C/P) getrennt, die zytoplasmatische und periplasmatische Proteine enthält. Die Fraktionen wurden mit Antiseren gegen die angegebenen Proteine untersucht. Als Kontrolle wurden Antiseren gegen ein integrales zytoplasmatisches Membranprotein, ComB10, und dem zytoplasmatischen Protein RecA verwendet. **(B)** Differentielle Extraktion einer *H. pylori* Gesamtmembranfraktion. Zur Beurteilung des Extraktionsverfahrens wurden Antiseren gegen AlpB, ein Protein der äußeren Membran, und gegen ComB10 benutzt. Die Verteilung der Proteine des Cag-Sekretionsapparats in den Fraktionen der äußeren Membran (OM) und der Zytoplasmamembran (CM) wurde durch Immunoblot der Fraktionen mit den entsprechenden Antiseren bestimmt.

Die Immunoblotanalyse dieser Fraktionen mit einem Antiserum gegen das integrale zytoplasmatische Membranprotein ComB10 (Hofreuter *et al.*, 2003) zeigte, dass die lösliche Fraktion keinerlei Membranproteine enthielt (**Abb.III.2.4A**). Da kein Antiserum gegen ein ausschließlich zytoplasmatisches *H. pylori* Protein verfügbar war, wurden die Fraktionen mit Antiserum gegen RecA untersucht, von dem bereits gezeigt wurde, dass es löslich im Zytoplasma und peripher assoziiert mit der Zytoplasmamembran vorliegt (Fischer and Haas, 2004). Die Western Blot-Analyse mit den Cag-Antiseren ergab, dass CagC, CagM, CagT, CagX und CagY in der Membranfraktion des *H.pylori*-Stammes 26695 vorhanden sind, während CagL fast ausschließlich in der löslichen Fraktion zu finden war, die zytoplasmatische und periplasmatische Proteine enthält. Cag α war sowohl in der löslichen als auch in der Membranfraktion vorhanden, was ähnlich zu den Daten für VirB11 ist (Krause *et al.*, 2000; Rashkova *et al.*, 1997).

Für eine genauere Untersuchung zur Lokalisierung der membran-assoziierten Proteine wurde eine Trennung der inneren und äußeren Membranen von *H. pylori* durchgeführt. Wie bereits früher beschrieben, ist eine Trennung der Membranen von *H. pylori*-Zellen nicht leicht durch Standardmethoden erreichbar, die für andere gramnegative Bakterien angewendet werden (Doig and Trust, 1994; Fischer *et al.*, 2001a). Deshalb wurde ein differentielles Extraktionsverfahren der Gesamtmembranfraktion angewendet. Entweder wurde das Detergenz N-Lauroyl-Sarkosin verwendet, das bevorzugt selektiv innere Membranproteine löslich macht oder Zwittergens 3-14, das entsprechend Proteine aus der äußeren Membran löst. Um die Spezifität der Extraktionen dieser beiden Detergenzien zu überprüfen, wurden Immunoblots mit Antiseren gegen ComB10 und AlpB, das ein Mitglied der Hop-Familie von äußeren Membranproteinen von *H. pylori* ist (Odenbreit *et al.*, 2002), durchgeführt. Wie aus **Abb.III.2.4B** ersichtlich wird, enthalten die mit Lauroyl-Sarkosin extrahierten äußeren Membranen die Mehrheit an AlpB und praktisch keine Kontamination mit ComB10. Im Gegensatz dazu enthalten die mit Zwittergens 3-14 extrahierten zytoplasmatischen Membranen den größten Teil von ComB10 und nur etwas Kontamination mit AlpB. Ein Vergleich beider Extraktionsverfahren erlaubt also folglich eine Zuweisung der Lokalisierung zur inneren Membran eines gegebenen Proteins. Dementsprechend ergab eine Immunoblotanalyse der Fraktionen mit verschiedenen Cag-Antiseren eine Lokalisierung in der inneren Membran für Cag α (in seiner membrangebundenen Form) und CagY. Bei CagC, CagM, CagT und CagX wurde ein Anteil der Proteine auch in den Fraktionen der äußeren Membran entdeckt, besonders deutlich zu sehen im Fall des VirB9-analogen Proteins CagX (**Abb.III.2.4B**). Diese Beobachtung legt nahe, dass diese Proteine wenigstens teilweise mit der äußeren Membran assoziiert sind.

2.4 Stabilisierungseffekte zwischen Apparatskomponenten

Die Bildung eines Multiproteinkomplexes wie beispielsweise eines Sekretionsapparats bedarf vieler Interaktionen zwischen den beteiligten Komponenten. Deshalb kann das Fehlen individueller Komponenten zur Destabilisierung anderer Untereinheiten führen, die normalerweise mit der fehlenden Komponente interagieren würden. Solche Stabilisierungseffekte sind gut bekannt für den VirB-Komplex von *A. tumefaciens*, wo beispielsweise eine Deletion im *virB7* Gen zu herabgesetzten Mengen von VirB9, VirB10 und VirB11 führt (Fernandez *et al.*, 1996b). Um ähnliche Stabilisierungsphänomene im Cag-System zu untersuchen, wurde die Produktion von Cag-Proteinen im Hintergrund von Deletionsmutanten in allen Genen, die für essentielle Sekretionsapparatskomponenten kodieren, analysiert (**Abb.III.2.5**, **Abb.III.2.6**).

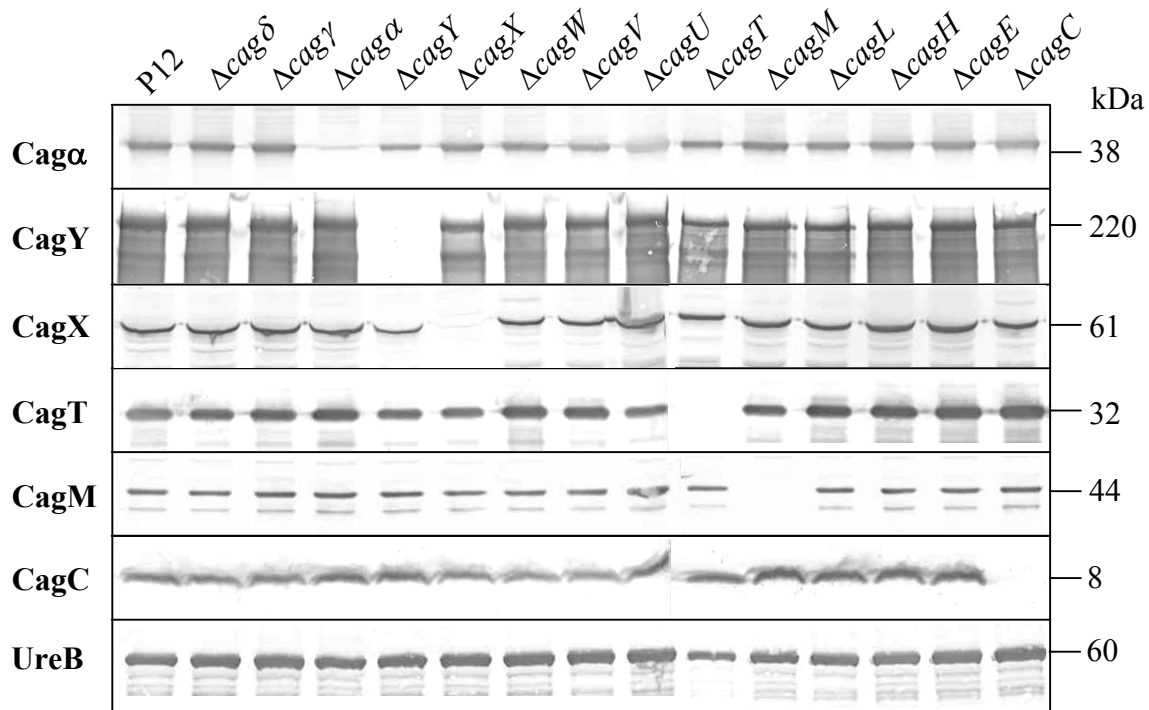


Abb.III.2.5: Stabilisierungseffekte zwischen Komponenten des Cag-Sekretionsapparats im Stamm P12. Die Produktion der angegebenen Proteine wurde in Zelllysaten isogener *H. pylori*-Mutanten in Genen, die für essentielle Proteine des Sekretionsapparats kodieren, bestimmt. Die Produktion der Urease B-Untereinheit (UreB) wurde als Kontrolle der eingesetzten Proteinmenge bestimmt. Gezeigt sind repräsentative Immunoblots. Ausgeprägte Stabilisierungseffekte, die auch durch Densitometrie bestätigt wurden, treten auf für das CagX Protein (in der *cagY* Mutante) und für das CagT Protein (in den *cagM*, *cagX* und *cagY*- Mutanten). Die schwache Produktion von Cagα in der *cagY*-Mutante und von CagT in der *cagU*-Mutante kommt möglicherweise aufgrund eines polaren Effekts zustande.

Eine densitometrische Analyse ergab, dass Cagα, CagY, CagM und CagC in vergleichbaren Mengen in allen Mutanten produziert wurden (Daten nicht gezeigt). Eine reduzierte Produktion von Cagα wurde nicht nur in der *cagY*-Mutante beobachtet (**Abb.III.2.5**), sondern auch in der *cagZ*-Mutante (Daten nicht gezeigt). Dies lässt darauf schließen, dass dieser Phänotyp aufgrund eines polaren Effekts der Deletionen auf die Expression des *cagα*-Gens zustande kommt. Ein ähnlicher Effekt auf abwärts gelegene Gene mag auch die Verringerung von CagT in der *cagU*-Mutante begründen, was deshalb nicht weiter betrachtet wurde.

CagX wird in vergleichbaren Mengen sowohl im Wildtyp als auch in allen Mutanten außer der *ΔcagY*-Mutante gebildet, wo eine densitometrische Erfassung eine Produktion von etwa $44\% \pm 4\%$ im Vergleich zum Wildtypstamm ergab (**Abb.III.2.5** und **Tab.III.2.7**). Diese Beobachtung lässt eine Stabilisierung von CagX durch CagY vermuten und somit auf eine Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen schließen. Ebenfalls wurde das CagT-Protein in signifikant geringeren Mengen in den *cagM*, *cagX* und *cagY*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp produziert (**Abb.III.2.5**). Die densitometrischen Werte lagen hier bei $60\% \pm 11\%$, $64\% \pm 3\%$ und $59\% \pm 4\%$ (**Tab.III.2.7**). Wiederum lässt sich vermuten, dass Interaktionen zwischen diesen Proteinen auftreten. Im Gegensatz dazu werden die Proteine CagM, CagX und CagY nicht in unterschiedlicher Menge in der *cagT*-Mutante gebildet, was darauf

hindeutet, dass das Vorhandensein dieser Proteine CagT in seinem korrekten Einbau in den Sekretionsapparat unterstützt.

Um auszuschließen, dass es sich bei den beobachteten Stabilisierungseffekten nicht um stammspezifische Beobachtungen handelt, wurde die Produktion von Cag-Proteinen im Hintergrund von Deletionsmutanten in allen Genen, die für essentielle Sekretionsapparatskomponenten kodieren, auch im Stamm 26695 untersucht (**Abb.III.2.6**).

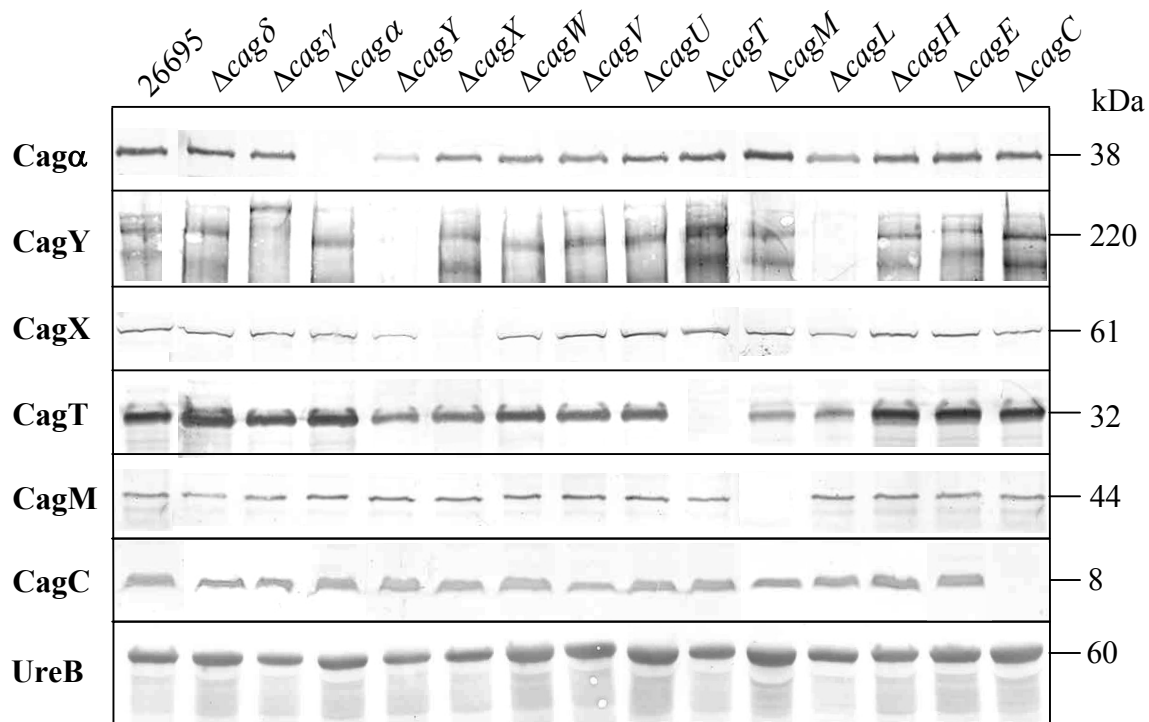


Abb.III.2.6: Stabilisierungseffekte zwischen Komponenten des Cag-Sekretionsapparats im Stamm 26695. Die Produktion der angegebenen Proteine wurde in Zelllysaten isogener *H. pylori* Mutanten in Genen, die für essentielle Proteine des Sekretionsapparats kodieren, bestimmt. Die Produktion der Urease B-Untereinheit (UreB) wurde als Kontrolle der eingesetzten Proteinmenge bestimmt. Gezeigt sind repräsentative Immunoblots. Ausgeprägte Stabilisierungseffekte, die auch durch Densitometrie bestätigt wurden, treten auf für das CagX Protein (in der *cagY* Mutante), für das CagT Protein (in den *cagM*, *cagX*, *cagY* und *cagL*- Mutanten) und CagY in der *cagL* Mutante. Die schwache Produktion von Cagα in der *cagY*-Mutante kommt möglicherweise aufgrund eines polaren Effekts zustande.

Auch im Stamm 26695 zeigten sich Stabilisierungseffekte zwischen den essentiellen Apparatskomponenten. Zunächst lässt sich festhalten, dass auch hier Cagα, CagY, CagM und CagC in vergleichbaren Mengen in allen Mutanten produziert wurden (Daten nicht gezeigt). Eine reduzierte Produktion von Cagα wurde wie im P12 Stamm in der *cagY*-Mutante beobachtet (**Abb.III.2.6**). Da auch in diesem Stamm in der *cagZ*-Mutante die Menge an Cagα reduziert war (Daten nicht gezeigt), lässt dies darauf schließen, dass es sich um denselben Phänotyp handelt, der aufgrund eines polaren Effekts der Deletionen auf die Expression des *caga*-Gens zustande kommt.

Die im Stamm P12 gezeigten Stabilisierungseffekte zwischen CagX und CagY und von CagT mit CagX, CagY und CagM ließen sich hier reproduzieren. So zeigte CagX in der *cagY*-Mutante nur eine etwa 40%ige Produktion gegenüber dem 26695 Wildtypstamm (**Tab.**

III.2.7). Die densitometrische Auswertung der Menge an CagT in den *cagX*, *cagY* und *cagM*-Mutanten ergab nur 67%, 56% und 31%. Diese Werte lagen im selben Bereich wie bereits im Stamm P12 festgestellt, außer, dass die Produktion von CagT in der *cagM*-Mutante nochmals um die Hälfte geringer war als bei P12. Somit konnten deutliche Stabilisierungseffekte zwischen CagX, CagY, CagM und CagT in zwei verschiedenen *H. pylori*-Stämmen beobachtet und reproduziert werden. Untenstehende **Tab. III.2.7** fasst diese Ergebnisse zusammen.

Tabelle III.2.7: Vergleich gefundener Stabilisierungseffekte in den *H. pylori*-Stämmen P12 und 26695

| Protein | Stamm | Produktion im Vergleich zum Wildtyp (als 100% gesetzt) |
|-----------------------|-------|--|
| CagX in $\Delta cagY$ | P12 | 44% |
| | 26695 | 40% |
| CagT in $\Delta cagY$ | P12 | 59% |
| | 26695 | 56% |
| CagT in $\Delta cagX$ | P12 | 64% |
| | 26695 | 67% |
| CagT in $\Delta cagM$ | P12 | 60% |
| | 26695 | 31% |

Weiterhin fällt auf, dass die Produktion von CagY in allen Mutanten mit dem Wildtyp vergleichbar ist, mit Ausnahme der *cagY*- und der *cagL*-Mutante. In der *cagY*-Mutante erscheint reproduzierbar eine zusätzliche CagY-Bande mit einem scheinbar höheren Molekulargewicht (**Abb.III.2.6**). Diese Bande wird auch im Wildtypstamm und in anderen Mutanten produziert, wenngleich in viel geringerer Menge. Auch zeigt sich dies nicht im Stamm P12 (**Abb.III.2.5**). In der *cagL*-Mutante ist das CagY-Protein instabil, wie bereits früher berichtet wurde (Rohde *et al.*, 2003). Hier wurden Abbauprodukte mit einer Größe von etwa 125 kDa gefunden. Auch die Menge an CagT-Protein ist in der *cagL*-Mutante deutlich reduziert und beträgt nur etwa 44% gegenüber dem Wildtypstamm 26695 (Daten nicht gezeigt). Auch lässt sich eine verringerte CagA-Produktion in dieser *cagL*-Mutante feststellen. Interessanterweise finden sich all diese Effekte, die die *cagL*-Mutante betreffen, nur im Stamm 26695, nicht aber im Stamm P12. Hier ist die Produktion aller getesteten Cag-Proteine vergleichbar mit der Produktion im P12 Wildtyp. Da in der getesteten *cagL*-Mutante des Stammes 26695 die Menge verschiedener Proteine des Cag-Sekretionsapparats reduziert ist, die genetisch nicht in unmittelbarer Nähe zueinander lokalisiert sind, scheint es sich bei den beobachteten Effekten um eine Anhäufung von Sekundärmutationen zu handeln und nicht um polare Effekte aufgrund des Ausschaltens des *cagL*-Gens.

2.5 Etablierung eines *Yeast-Two-Hybrid*-Assays zur Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen *cag*-PAI-Proteinen

2.5.1 Klonierung von *cag*-Genen in *Yeast-Two-Hybrid*-Vektoren und Transformation in *Saccharomyces cerevisiae*

Ausgehend von den Interaktionen zwischen Apparatskomponenten, auf die bereits aus der gegenseitigen Stabilisierung geschlossen werden kann, erwartet man viele zusätzliche Interaktionen. Um diese zu identifizieren wurde ein umfassender *Yeast-Two-Hybrid*-Screen durchgeführt, der alle Komponenten des Cag-Typ IV-Sekretionssystems miteinschloss. Zu diesem Zweck wurden vollständige und partielle *cag*-Gene (siehe **Tabelle III.2.8**) durch rekombinatorische Klonierung in die *Yeast-Two-Hybrid* *bait*- und *prey*-Vektoren kloniert (siehe **Kapitel II.2.4.8**). Diese Klonierungsmethode nach der Gateway®-Technologie nutzt die Vorteile einer sequenz-spezifischen Rekombination des Bakteriophagen Lambda für das Einsetzen von DNA-Sequenzen in verschiedene Vektorsysteme. Ein DNA-Fragment des Interesses liegt dabei in Form einer Genkassette vor und kann höchst effizient gleichzeitig in verschiedene Vektoren durch Austausch dortiger Genkassetten eingesetzt werden, ohne dass Restriktionsschnittstellen berücksichtigt werden müssten. Da die ausgetauschten Genkassetten eine Chloramphenicol-Resistenzgenkassette besitzen und diese beim Austausch durch die Kassette mit dem gewünschten DNA-Fragment verloren geht, kann die nun erhaltene Chloramphenicol-Sensitivität zur schnellen Identifizierung von positiven Klonen, ohne vorherige Plasmidpräparation und Restriktion der erhaltenen Plasmide, eingesetzt werden.

Aufgrund der charakteristischen Domänenstruktur des CagY/HP527-Proteins (Aras *et al.*, 2003a; Liu *et al.*, 1999) wurde das *cagY*-Gen in drei Teile zerlegt, die einmal der 5'-Repeatregion (Aminosäuren 1-344, als CagY_a/527_a bezeichnet), der mittleren Repeatregion einschließlich der 5' und 3' konservierten Bereiche (Aminosäuren 363-1799, CagY_b/527_b) und schließlich den Bereich mit Ähnlichkeit zu VirB10 (Aminosäuren 1815-1927, CagY_c/527_c), enthielt. Aus dem *cagβ*-Gen wurde eine Region, die für eine mögliche periplasmatische Schleife kodiert (Aminosäuren 91-146, als Cagβ_a/524_a bezeichnet), sowie die für den großen zytoplasmatischen Bereich kodierende Region (Aminosäuren 162-748, Cagβ_b/524_b) separat kloniert. Bei den Genen *cagE* und *cagH* wurde jeweils nur der für die vorhergesagten zytoplasmatischen Domänen kodierende Bereich kloniert, für das Gen *cagV* nur die Region der periplasmatischen Domäne (AS 38-252, siehe auch **Abb.III.2.1**). Alle anderen Gene wurden als Gesamtlängen-Konstrukte ohne ihre N-terminalen Signalsequenzen, soweit zutreffend, kloniert. Anschließend erfolgte die Transformation der *bait*- und *prey*-Vektoren in die jeweiligen Hefestämme Y187 bzw. AH109 (siehe unter **Kapitel II.2.2.4**).

Tabelle III.2.8: Cag-Gene oder Genfragmente, die mittels des *Yeast-Two-Hybrid*-Assays auf Interaktionen untersucht wurden.

| Gen | Proteinbezeichnung | Region (Aminosäurepositionen) |
|--------------|--------------------|-------------------------------|
| <i>hp520</i> | Cag ζ | 1-116 |
| <i>hp521</i> | Cag ϵ | 1-80 |
| <i>hp522</i> | Cag δ | 23-481 |
| <i>hp523</i> | Cag γ | 1-169 |
| <i>hp524</i> | Cag β_a | 95-146 |
| <i>hp524</i> | Cag β_b | 162-748 |
| <i>hp525</i> | Cag α | 1-330 |
| <i>hp526</i> | CagZ | 1-199 |
| <i>hp527</i> | CagY _a | 1-345 |
| <i>hp527</i> | CagY _b | 363-1799 |
| <i>hp527</i> | CagY _c | 1815-1927 |
| <i>hp528</i> | CagX | 29-522 |
| <i>hp529</i> | CagW | 26-535 |
| <i>hp530</i> | CagV | 59-252 |
| <i>hp531</i> | CagU | 1-218 |
| <i>hp532</i> | CagT | 21-280 |
| <i>hp534</i> | CagS | 1-196 |
| <i>hp535</i> | CagQ | 1-126 |
| <i>hp536</i> | CagP | 1-114 |
| <i>hp537</i> | CagM | 18-376 |
| <i>hp538</i> | CagN | 25-306 |
| <i>hp539</i> | CagL | 21-237 |
| <i>hp540</i> | CagI | 24-381 |
| <i>hp541</i> | CagH | 52-370 |
| <i>hp542</i> | CagG | 28-142 |
| <i>hp543</i> | CagF | 1-268 |
| <i>hp544</i> | CagE | 82-983 |
| <i>hp545</i> | CagD | 31-207 |
| <i>hp546</i> | CagC | 1-115 |
| <i>hp547</i> | CagA | 1-1186 |
| <i>hp547</i> | CagA _a | 1-613 |
| <i>hp547</i> | CagA _b | 565-1186 |

2.5.2 Generierung diploider Hefen durch *Mating*

Um Protein-Protein-Interaktionen zu bestimmen wurden diploide Hefezellen mit allen möglichen Kombinationen von *bait*- und *prey*-Plasmiden generiert und auf Wachstum auf Dreifachselektivmedium (SD Leu⁻/Trp⁻/His⁻) getestet (siehe **Kapitel II.2.2.5 u. II.2.2.6**). Zunächst wurde eine Masterplatte mit allen die *prey*-Konstrukte enthaltenden Hefen erstellt. Dazu wurden die Hefen in Duplikaten in einer 96-Well-Platte kultiviert und mit einem 384-Nadel-Replikator auf eine SD (*synthetic dextrose*)-Agarplatte gestempelt. Daraus resultierte eine Anordnung von acht Kolonien (zwei Quadruplikate) für jedes Konstrukt (**Abb.III.2.9A**). Zum anschließenden *Mating* mit den die *bait*-Konstrukte enthaltenden Hefen wurde die *prey*-Masterplatte auf Vollmedium (YPD) repliziert, jeweils eine Platte pro *bait*-Konstrukt. Die *bait*-Hefestämme wurden einzeln oben auf die jeweilige Masterplatte transferiert

(Abb.III.2.9B). Anschließend wurde den beiden Hefestämmen das *Mating* für 24 h erlaubt, bevor auf die entstandenen diploiden Hefen selektiert wurde. Hierfür wurde die jeweilige *Mating*-Platte auf eine Doppelselektiv-Platte (SD-Medium ohne Leu und Trp, zur Selektion auf beide Konstrukte) transferiert und somit alle möglichen Kombinationen von *bait*- und *prey*-Plasmiden generiert (Abb.III.2.9C).

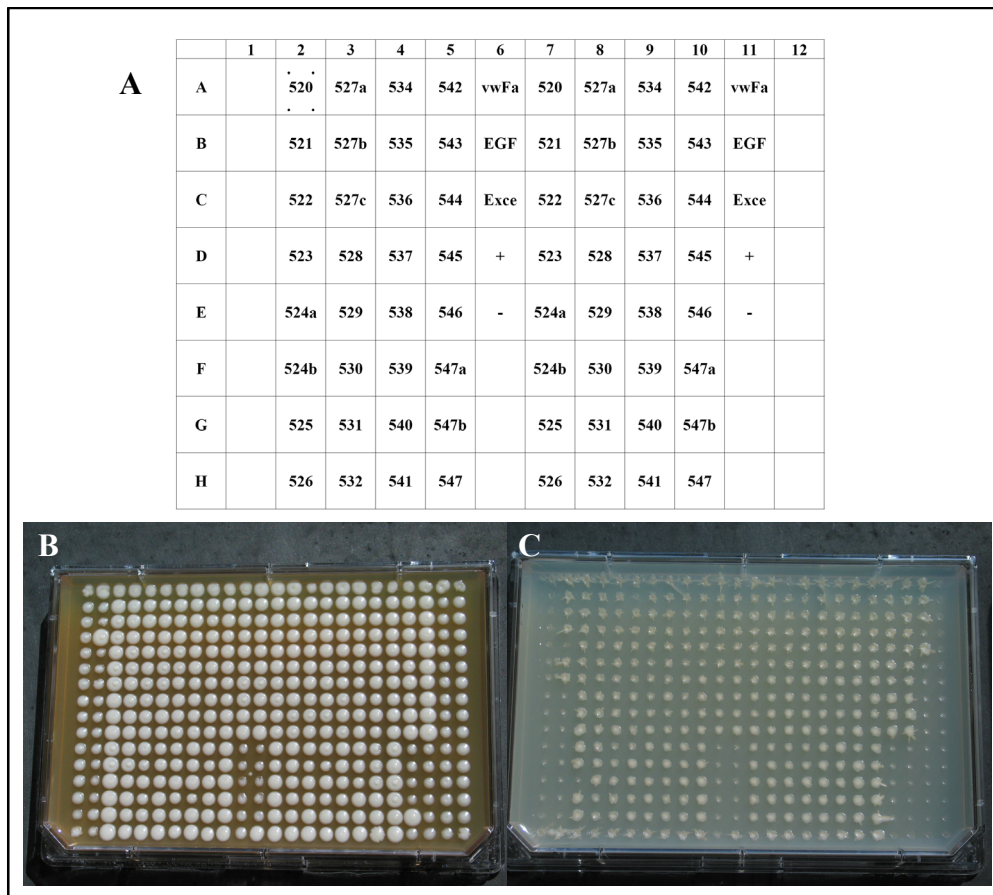


Abb.III.2.9: Generierung einer *prey*-Masterplatte, *Mating* und Selektion diploider Hefen im *Yeast-Two-Hybrid-Screen*. (A) Schematische Darstellung einer Masterplatte des Y2H-Screens. Die Hefen mit den jeweiligen Konstrukten wurden in Duplikaten mit einem 384-Nadel-Replikator gestempelt. Daraus resultierten acht (2x4) Kolonien pro Konstrukt (angedeutet für 4 Kolonien bei A2 für *hp0520*). (B) Darstellung einer *Mating*-Platte (hier für *bait hp523/cag*). Die Hefezellen wurden separat mit den *bait*- und *prey*-Plasmiden transformiert. Das *Mating* der Hefen der *prey*-Masterplatte mit Hefen mit je einem *bait*-Konstrukt fand auf Vollmedium-Platten (YPD) statt. (C) Zur anschließenden Selektion diploider Hefen wurde die *Mating*-Platte auf eine Doppelselektiv-Platte gestempelt (hier für *bait hp520/cag*).

2.6 Bestimmung von Protein-Interaktionen mit dem *Yeast-Two-Hybrid-Assay*

Nachdem die diploiden Hefen auf den Doppelselektiv-Platten (SD Leu⁻/Trp⁻) gewachsen waren, erfolgte die Bestimmung von interagierenden Proteinen. Dazu wurden die Masterplatten mit den diploiden Hefen auf Dreifachselektiv-Platten (SD Leu⁻/Trp⁻/His⁻) gestempelt. Auf diesen histidinfreien Platten findet nur bei denjenigen *bait*- und *prey*-Kombinationen Wachstum statt, bei denen beide Interaktionspartner miteinander interagieren und dadurch das Reportergen für die Histidinbiosynthese exprimiert wird. In **Abb.III.2.10A** ist beispielhaft die Platte mit diploiden Hefen für das *bait*-Konstrukt der Positivkontrolle gezeigt. Auf der gezeigten Platte wurden jeweils acht Kolonien mit den verschiedenen *prey*-Plasmiden mit einem Hefestamm gematet, der das *bait*-Plasmid der Positivkontrolle enthält. Ein Replikat dieser Platte aus **Abb.III.2.10A** auf Dreifachselektiv-Medium (SD Leu⁻/Trp⁻/His⁻) ist in **Abb.III.2.10B** gezeigt. Das alleinige Wachstum der acht Kolonien, die das Kontrollplasmid der *prey*-Positivkontrolle enthalten, zeigt die Spezifität des Selektionsverfahrens.

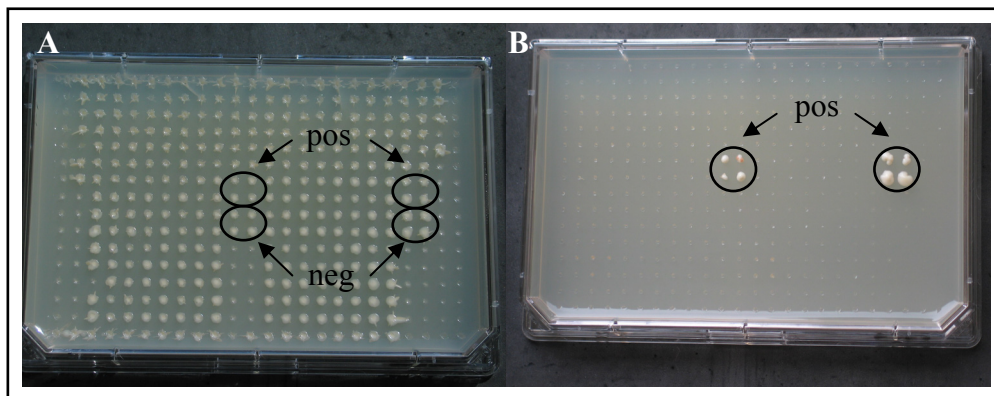


Abb.III.2.10: Bestimmung von Interaktionen im *Yeast-Two-Hybrid-Assay*. (A) Platte mit diploiden Hefen der verschiedenen *prey*-Vektoren mit dem *bait*-Plasmid der Positivkontrolle. Hervorgehoben sind jeweils die acht Kolonien der Kombinationen *prey*-Positivkontrolle mit *bait*-Positivkontrolle (pos) und *prey*-Negativkontrolle mit *bait*-Positivkontrolle (neg). (B) Replikat der Platte aus (A) auf einer SD-Medienplatte ohne Leucin, Tryptophan und Histidin. Hervorgehoben sind die acht Kolonien der Kombination aus *prey*-Positivkontrolle mit *bait*-Positivkontrolle. Das alleinige Wachstum dieser Interaktionspartner zeigt die Spezifität des Assays.

2.6.1 Arten gefundener Interaktionen

Interaktionen wurden für insgesamt 28 verschiedene Kombinationen von *bait*- und *prey*-Plasmiden gefunden. Dabei wurde Wachstum nach 2-3 Tagen in Anwesenheit des kompetitiven Inhibitors 3-Aminotriazol als starke Interaktion erachtet, Wachstum zu einem späteren Zeitpunkt oder in Abwesenheit von 3-Aminotriazol deutete schwächere Interaktionen an. Einige *bait*-Konstrukte besaßen autoaktivierende Eigenschaften, wodurch es zu unspezifischem Wachstum der Hefen auf den SD Leu⁻/Trp⁻/His⁻-Platten kam. **Abb.III.2.11C** zeigt dies beispielhaft am CagM *bait*-Konstrukt. Repliziert man solch eine Platte auf Dreifachselektiv-Medium mit dem Kompetitor 3-Aminotriazol, so kann oftmals schon mit niedrigen Konzentrationen das unspezifische Wachstum reduziert und positive Interaktionen ermittelt werden, wie dies hier am Beispiel der Interaktionen von CagM mit sich selbst und CagX gezeigt ist (**Abb.III.2.11D**).

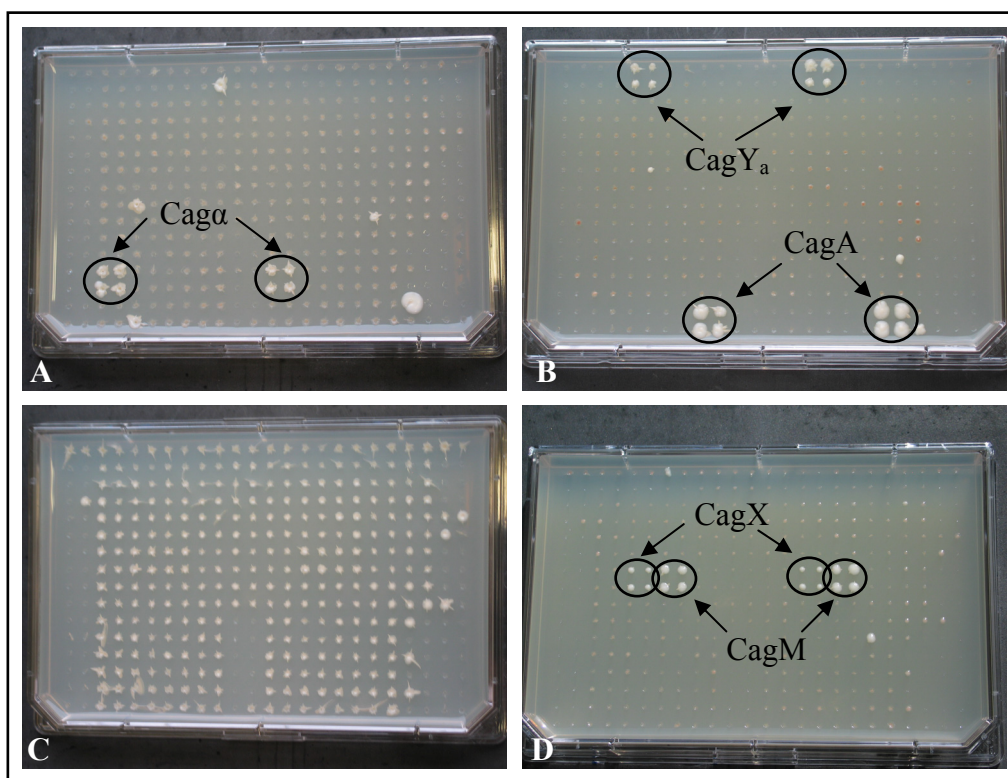


Abb.III.2.11: Identifizierung von Protein-Interaktionen zwischen *cag*-Proteinen mit dem *Yeast-Two-Hybrid-Assay*. (A) Dreifachselektiv-Platte mit dem Cagα *bait*-Plasmid zeigt die homotypische Cagα-Cagα Interaktion. (B) Heterotypische Interaktionen mit dem CagF *bait*-Plasmid. (C). Unspezifisches (autoaktivierendes) Wachstum des CagM *bait*-Konstrukts auf einer Dreifachselektiv-Platte. (D) Replikant der in (C) gezeigten Platte auf Dreifachselektiv-Medium mit 5mM 3-Aminotriazol zeigt die Interaktionen von CagM mit sich selbst und CagX.

Abb.III.2.11 zeigt Beispiele gefundener Interaktionen, wie die homotypische Interaktion von Cag α mit sich selbst (**Abb.III.2.11A**). Diese war bereits auch schon früher durch andere Techniken beschrieben worden (Yeo *et al.*, 2000). Auch die bereits bekannte heterotypische Interaktion von CagA mit CagF (Couturier *et al.*, 2006; Pattis *et al.*, 2007) wurde gefunden (**Abb.III.2.11B**), was die Nützlichkeit der Methode bestätigte. Weiterhin schlossen die Ergebnisse auch verschiedene Interaktionen mit ein, die kürzlich in einem ähnlichen *Yeast-Two-Hybrid*-Ansatz ebenfalls gefunden wurden (Busler *et al.*, 2006). Beispielsweise wurden die Interaktionen zwischen CagY_a und CagF, zwischen CagM und CagX und CagM mit sich selbst ebenso in dieser Studie entdeckt (**Tabelle III.2.12**). Allerdings war es mit dem Ansatz in dieser Arbeit auch möglich, eine weitere Auswahl an neuen Protein-Protein-Interaktionen zu identifizieren. So wurde gefunden, dass die nicht-essentielle Apparatskomponente CagN mit den essentiellen Komponenten CagV und CagY interagiert. Auch wurden Interaktionen zwischen der periplasmatischen Domäne von Cag β und den Apparatskomponenten CagY und CagL beobachtet. **Tabelle III.2.12** fasst alle gefundenen Interaktionen im *Yeast-Two-Hybrid*-Screen zusammen. Die Klassifizierung fand nach den im nächsten **Kapitel III.2.6.2** beschriebenen β -Galaktosidase-Werten statt.

Eine genauere Beschreibung der Interaktionen zwischen CagA und seinen Translokationsfaktoren findet sich an anderer Stelle (**Kapitel III.4.1**).

Tabelle III.2.12. Protein-Protein Interaktionen zwischen Komponenten des Cag-Sekretionssystems, die mit dem *Yeast-Two-Hybrid*-Ansatz identifiziert wurden.

| Bait-Protein | Prey-Protein | β -Galactosidase-Aktivität ^a | Bereits beschriebene Interaktion(en) ^b |
|-------------------|-------------------|---|---|
| Cag β_a | CagA _a | ++ | (-) |
| Cag β_a | CagY _c | ++ | (-) |
| Cag β_b | CagZ | +++ | (+) ^{c,h} |
| Cag α | Cag α | ++ | (+) ^{c,d} |
| CagZ | Cag β_a | ++ | (-) |
| CagY _a | CagF | ++ | (+) ^{c,e} |
| CagY _b | CagN | + | (-) |
| CagY _b | CagY _c | ++ | (-) |
| CagY _c | CagY _b | + | (-) |
| CagX | CagM | +++ | (+) ^c |
| CagV | CagN | ++ | (-) |
| CagU | CagA | + | (-) |
| CagT | Cag β_a | ++ | (-) |
| CagM | CagX | +++ | (+) ^c |
| CagM | CagM | +++ | (+) ^c |
| CagN | CagY _b | + | (-) |
| CagL | Cag β_a | + | (-) |
| CagH | Cag β_a | + | (-) |
| CagF | CagY _a | +++ | (-) ^f |
| CagF | CagA | +++ | (+) ^g |
| CagF | CagX | + | (-) |
| CagA | CagF | ++ | (+) ^g |
| CagA _a | Cag β_a | +++ | (-) |
| CagA | Cag β_b | + | (-) |
| CagA _a | CagI | + | (-) |
| CagA | CagG | + | (-) |
| CagA _a | CagY _c | + | (-) |
| CagA _a | CagA _b | + | (-) |

^a +++ , β -Galaktosidase-Aktivität höher als die Positivkontrolle (> 35 Miller Units).
 ++ , β -Galaktosidase-Aktivität ähnlich der Positivkontrolle (28-35 Miller Units).
 + , β -Galaktosidase-Aktivität niedriger als die Positivkontrolle aber signifikant höher als die Negativkontrolle (21-28 Miller Units).

^b +, ja; -, nein.

^c identifiziert als *Yeast-Two-Hybrid*-Interaktion (Busler *et al.*, 2006).

^d identifiziert als Hexamer in der Kristallstruktur (Yeo *et al.*, 2000).

^e die von Busler *et al.*, 2006 verwendete Region von CagY reichte von Aminosäuren 1-500, die hier verwendete Region von Aminosäuren 1-345.

^f in der Studie von Busler *et al.*, 2006, wurde die *Yeast-Two-Hybrid*-Interaktion zwischen CagY_a und CagF nur in einer Richtung gefunden.

^g identifiziert durch Co-Immunpräzipitation und *Pulldown*-Experimente (Couturier *et al.*, 2006; Pattis *et al.*, 2007).

^h die hier verwendete Region reichte von Aminosäuren 162-748, während im Screen von Busler *et al.*, 2006 das gesamte Protein verwendet wurde.

2.6.2 Quantifizierung gefundener Y2H-Proteininteraktionen durch Messung der β -Galaktosidase-Aktivität

Um die im vorigen Kapitel genannte Klassifizierung der *Yeast-Two-Hybrid*-Interaktionen nach Wachstum in einem unabhängigen Assay zu bestätigen, wurde für alle diploiden Hefen, die auf dreifachselektiven Platten wuchsen, die Expression des *lacZ*-Reportergens getestet (siehe **Kapitel II.2.2.7** für Details). Als Kontrollen wurden die diploiden Hefen, die die Positiv- und Negativkontrollplasmide enthielten, verwendet. Alle diploiden Hefen, die auf Dreifachselektiv-Platten wuchsen, zeigten eine höhere β -Galaktosidase-Aktivität als die Hefezellen mit den Negativ-Kontrollvektoren (siehe **Abb.III.2.13** und **Abb.III.4.1**). Die Interaktionen wurden nach ihrer β -Galaktosidase-Aktivität als stark, mittel und schwach eingestuft (siehe **Tabelle III.2.12**).

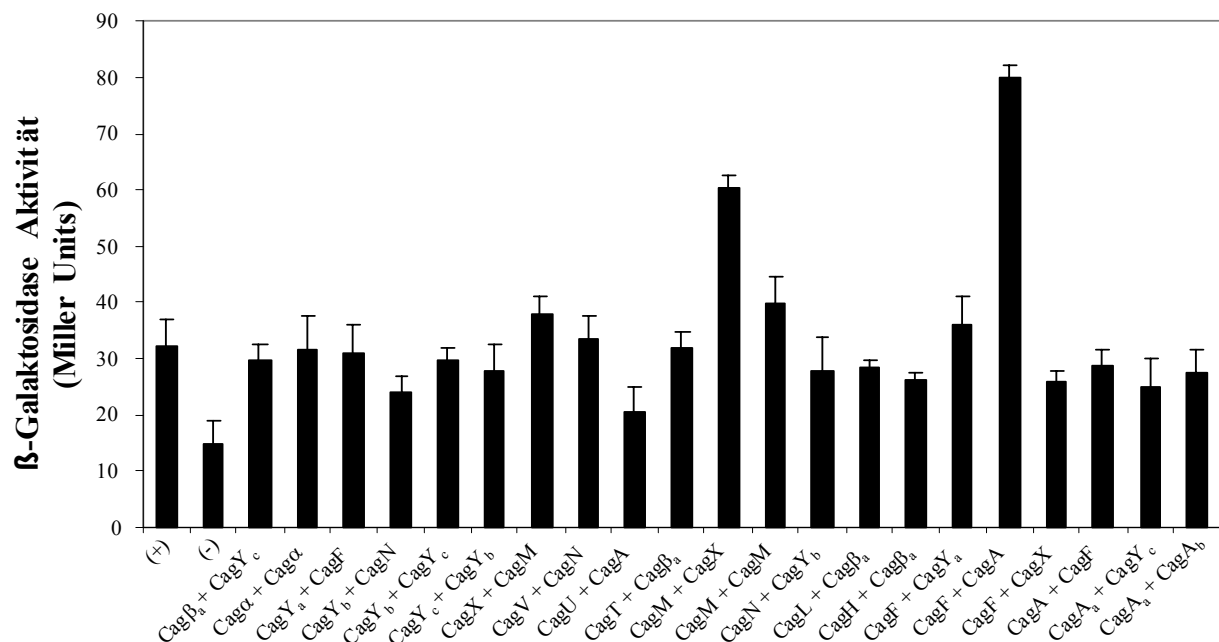


Abb.III.2.13: β -Galaktosidase-Aktivität gefundener Protein-Protein Interaktionen zwischen Cag-Proteinen im *Yeast-Two-Hybrid*-Screen. Diploide Hefezellen, die die angegebenen Plasmidpaare enthielten (angegeben als *bait* + *prey*-Plasmid) und auf Dreifachselektiv-Medium (SD-Medium ohne Leucin, Tryptophan und Histidin) wuchsen, wurden zusammen mit Hefen, die die Positivkontroll (+)- und Negativkontroll-Plasmide (-) enthielten, auf β -Galaktosidase-Aktivität überprüft (siehe **Kapitel II.2.2.7**). Die gezeigten Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten einschließlich der Standardabweichungen. Die gezeigten Aktivitäten wurden, wie in **Tabelle III.2.12** veranschaulicht, in drei Kategorien klassifiziert.

Abb.III.2.13 zeigt die Werte der β -Galaktosidase-Messungen gefundener Interaktionen im *Yeast-Two-Hybrid*-Assay. Dargestellt sind die bereits beschriebenen Interaktionen (siehe **Tabelle III.2.12**), sowie die Interaktionen zwischen Apparatskomponenten.

Die Werte für Interaktionen, bei denen Translokationsfaktoren untereinander bzw. mit CagA interagieren, werden der Anschaulichkeit halber an anderer Stelle gesondert behandelt, sind allerdings in **Tabelle III.2.12** miteingeschlossen.

2.7 Identifizierung eines Komplexes des Cag-Typ IV-Sekretionsapparats

Um Protein-Interaktionen zu bestätigen, für die es bereits Anhaltspunkte durch die Stabilisierungseffekte und die *Yeast-Two-Hybrid*-Daten gab, sollten Co-Immunpräzipitationen mit vorhandenen Antiseren gegen Cag-Apparatsproteine durchgeführt werden. Als besonders interessant stellten sich die möglichen Wechselwirkungen zwischen CagX, CagY, CagM und CagT heraus, da einerseits schon Stabilisierungseffekte auf mögliche Interaktionen hindeuteten. So erscheint CagX destabilisiert in der *cagY*-Mutante und CagT wird in geringeren Mengen in den *cagX*-, *cagY*-, und *cagM*-Mutanten gebildet (**Abb.III.2.5, Abb.III.2.6, Tab.III.2.7, Kapitel III.2.4**). Andererseits lassen sich direkte Interaktionen zwischen CagX und CagM, sowie von CagM und CagY mit sich selbst im *Yeast-Two-Hybrid*-Assay feststellen (**Abb.III.2.11, Tabelle III.2.12, Kapitel III.2.6.1**).

Zur Bestimmung von Wechselwirkungen wurden die Proteine aus Gesamtzellextrakten der Wildtyp *H. pylori*-Stämme 26695 und P12 und den entsprechenden isogenen Mutanten immunpräzipitiert. In allen Fällen wurden die Lysate vorher mit ProteinG-Agarose abgesättigt, um unspezifisch anhaftende Proteine zu entfernen. Nach Präzipitation des gewünschten Proteins wurde per Immunoblotanalyse untersucht, ob die Präzipitation erfolgreich war und ob mögliche Interaktionspartner co-präzipitiert wurden.

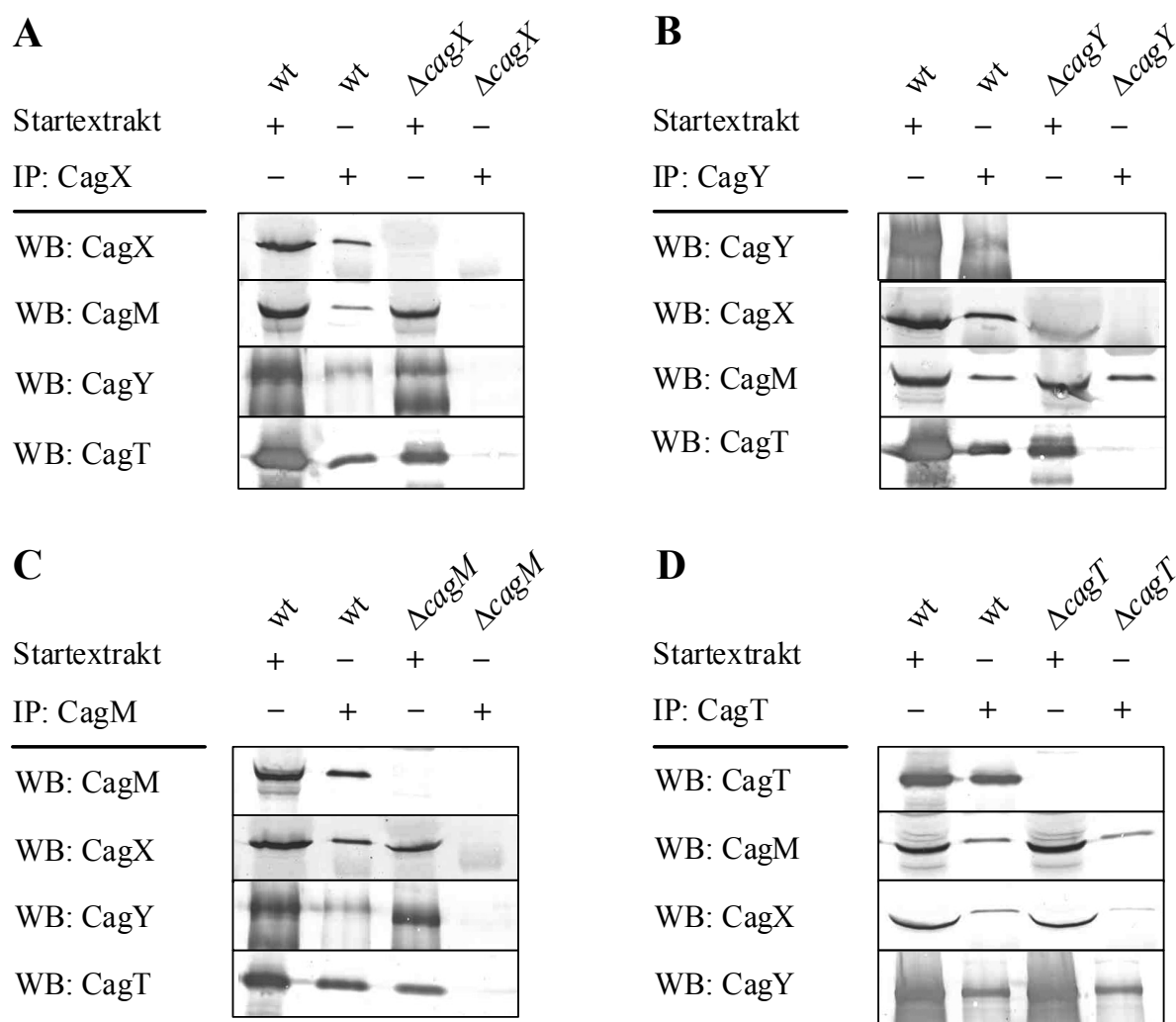


Abb. III.2.14: Identifizierung eines Subkomplexes des Cag-Sekretionsapparats bestehend aus CagT, CagM, CagX und CagY in *H. pylori* Zellen. Die Bakterien wurden in RIPA-Puffer lysiert und die Lysate (=Startextrakte) wurden mit ProteinG-Agarose inkubiert, um unspezifisch bindende Proteine zu entfernen. Anschließend erfolgte eine Immunpräzipitation (IP) mit Antisera gegen CagX (A), CagY (B), CagM (C) und CagT (D). Co-präzipitierende Proteine wurden mittels Western Blot (WB) mit den angegebenen Antisera identifiziert. Kontroll-Immunpräzipitationen mit den entsprechenden isogenen Mutanten zeigen die Spezifität der Co-Immunpräzipitationen. Dabei zeigte sich, dass CagM unspezifisch in der CagY-Präzipitation co-präzipitierte. Die CagT-Präzipitation wurde ebenfalls nicht weiter verwendet bzw. untersucht, da hier sowohl CagM und CagX, als auch CagY unspezifisch in der *cagT*-Mutante co-präzipitierten. wt, Wildtyp.

Zunächst lässt sich festhalten, dass alle Antisera gegen CagX, CagY, CagM und CagT das entsprechende Protein erkannten und auch präzipitieren konnten (Abb. III.2.14A-D). In der CagX-Immunpräzipitation aus Wildtypzellen konnte eine Co-Präzipitation von CagM, CagY und CagT beobachtet werden. Obwohl diese Proteine auch im Startextrakt der *cagX*-Mutante vorhanden waren, wurde keines der Proteine aus der *cagX*-Mutante präzipitiert, was die Spezifität des Präzipitationsexperiments zeigt (Abb. III.2.14A). Ähnlich hierzu wurden auch CagX, CagM und CagT mit CagY in Immunpräzipitationen mit dem CagY-Antiserum co-präzipitiert (Abb. III.2.14B). Allerdings wurde CagM auch unspezifisch mit dem CagY-Antiserum aus der *cagY*-Mutante präzipitiert, während dies bei CagX und CagT nicht der Fall war (Abb. III.2.14B). Dies deutet wiederum auf spezifische Interaktionen zwischen CagX, CagT und CagY hin. Schließlich wurden auch CagX, CagY und CagT mit CagM aus

Wildtypzellen co-präzipitiert, aber nicht aus der *cagM*-Mutante (Abb.III.2.14C). Immunpräzipitationen mit dem CagT-Antiserum führten zu einer Co-Präzipitation von CagY, CagX und CagM und diese Proteine wurden allerdings auch aus der *cagT*-Mutante präzipitiert (Abb.III.2.14D). Daher mussten diese Ergebnisse als unspezifisch erachtet werden. Es wurden keine Co-Präzipitationen von CagL, CagF oder CagC in diesen Immunpräzipitationen beobachtet (Abb. III. 2.15).

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse klar an, dass CagX, CagM, CagT und CagY einen Komplex in *H. pylori* bilden.

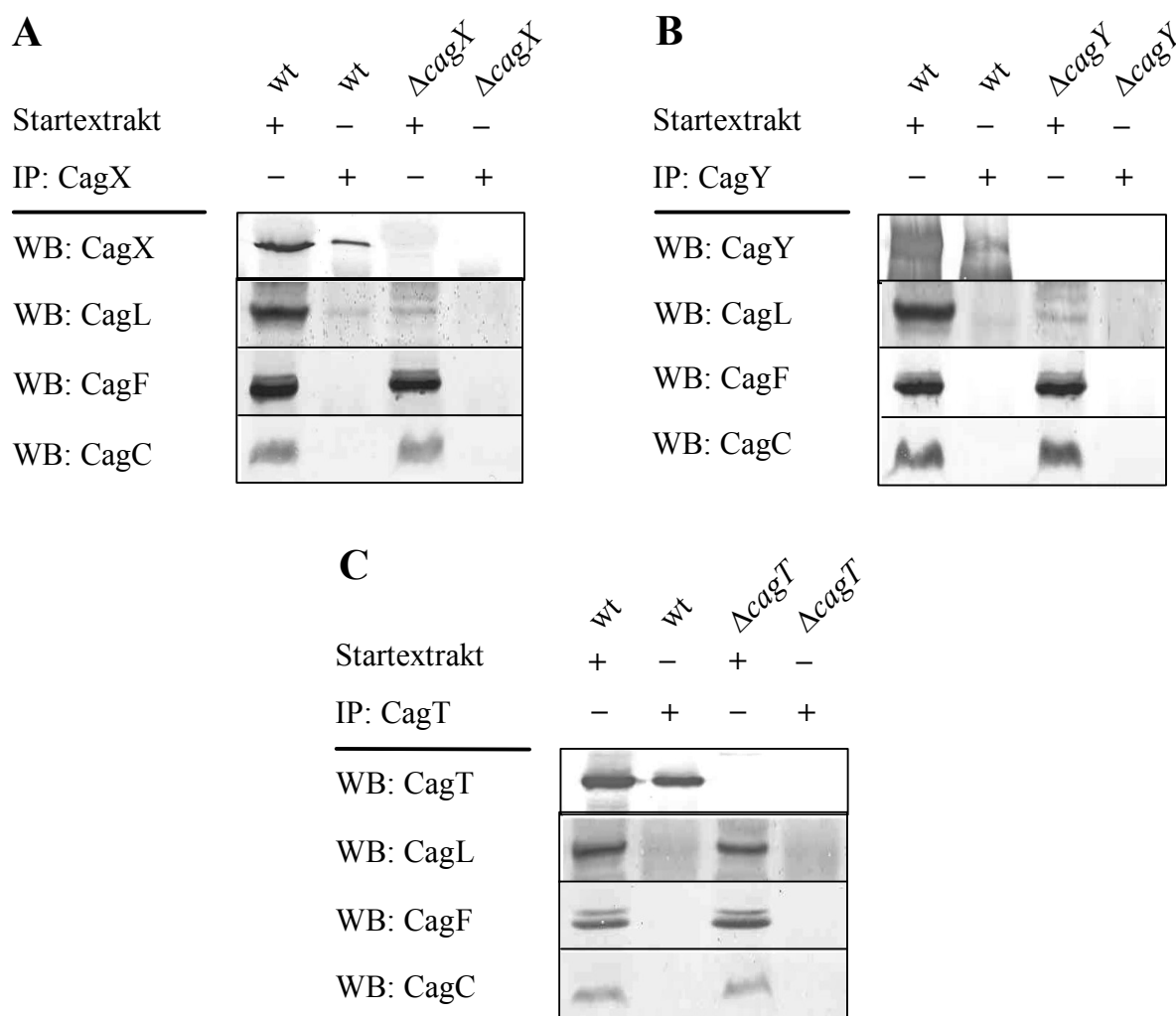


Abb III.2.15: Keine Co-Präzipitation von CagL, CagF oder CagC mit den Komponenten CagX, CagY und CagT des Subkomplexes des Cag-Sekretionsapparats in *H. pylori* Zellen. Die Bakterien wurden in RIPA-Puffer lysiert und die Lysate (= Startextrakte) wurden mit ProteinG-Agarose inkubiert, um unspezifisch bindende Proteine zu entfernen. Anschließend erfolgte eine Immunpräzipitation (IP) mit Antiseren gegen CagX (A), CagY (B), und CagT (C). Co-präzipitierende Proteine wurden mittels Western Blot (WB) mit den angegebenen Antiseren identifiziert. Kontroll-Immunpräzipitationen mit den entsprechenden isogenen Mutanten zeigen die Spezifität der Co-Immunpräzipitationen. wt, Wildtyp.

2.8. Nachweis direkter Interaktionen

Um zu unterscheiden, ob die gegenseitigen Interaktionen zwischen CagY, CagX, CagT und CagM direkter oder indirekter Natur sind, wurden die einzelnen Co-Immunpräzipitations-experimente in isogenen Mutantenstämmen durchgeführt, denen jeweils eine der anderen Komponenten fehlte.

2.8.1 CagM interagiert direkt mit CagX

Nach den *Yeast-Two-Hybrid*-Daten sollte die Interaktion zwischen CagX und CagM direkter Natur sein (siehe **Kapitel III.2.6.1**). Übereinstimmend damit präzipitierte CagM mit CagX sowohl in der *cagT*-Mutante als auch der *cagY*-Mutante (**Abb.III.2.16A**). Gleichermäßen präzipitierte auch CagX mit CagM aus den *cagT*- und *cagY*-Mutanten. Dies gibt an, dass die Interaktion zwischen CagX und CagM unabhängig von CagT und CagY ist (**Abb.III.2.16B**). Die schwache CagM-Copräzipitation in der *cagY*-Mutante ist wahrscheinlich auf die verminderte Produktion von CagX in dieser Mutante zurückzuführen (**Abb.III.2.14B** und **Abb.III.2.5**, **Abb.III.2.6** und **Tab.III.2.7**).

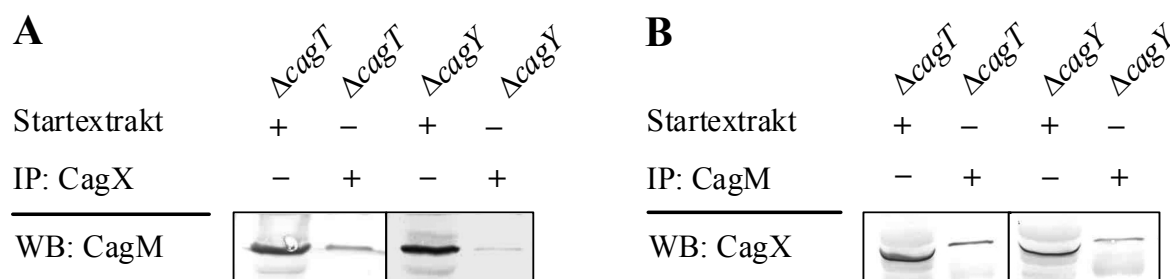


Abb.III.2.16: Die CagM-CagX-Interaktion ist unabhängig von CagT und CagY. Die Immunpräzipitationen mit Antiseren gegen CagX und CagM wurden durchgeführt wie in der Legende zu **Abb.III.2.14** beschrieben, außer dass die angegebenen isogenen Mutanten benutzt wurden. **(A)** Immunpräzipitation (IP) von CagX in der *cagT*- und *cagY*-Mutante. Der Western Blot (WB) mit CagM-Antiserum zeigt, dass CagM co-präzipitiert wird. **(B)** Immunpräzipitation (IP) von CagM in der *cagT*- und *cagY*-Mutante. Der Western Blot (WB) mit CagX-Antiserum zeigt, dass CagX ebenfalls mit CagM co-präzipitiert wird.

2.8.2 CagX interagiert direkt mit CagY

Wie aus **Abb.III.2.17** ersichtlich ist, co-präzipitiert CagY in der CagX-Immunpräzipitation (**Abb.III.2.17A**) und CagX in der CagY-Immunpräzipitation (**Abb.III.2.17B**) unabhängig von der Anwesenheit von CagT oder CagM. Dies zeigt an, was auch schon die Stabilisierungseffekte andeuteten (siehe **Abb.III.2.5**, **Abb.III.2.6**, **Tab.III.2.7**, **Kapitel III.2.3**), dass die Interaktion zwischen CagX und CagY wahrscheinlich direkter Natur ist. Auch wurden Interaktionen zwischen CagX und CagY in einem anderen *Yeast-Two-Hybrid*-Ansatz identifiziert (Busler *et al.*, 2006), was die direkte Natur dieser Interaktion untermauert.

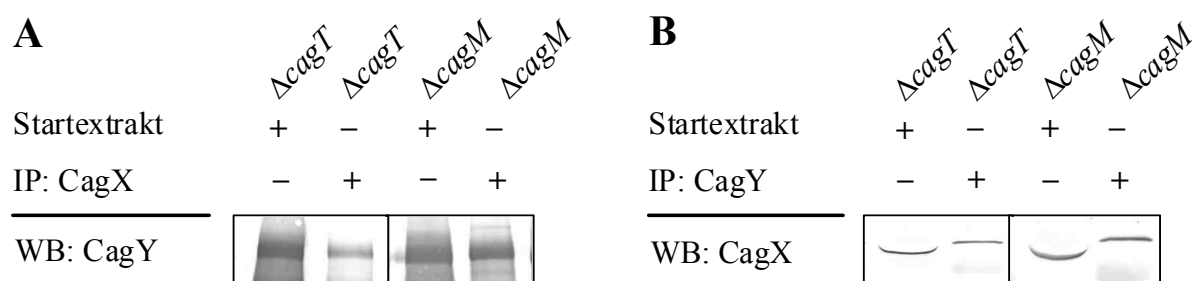


Abb.III.2.17: Die CagX-CagY-Interaktion ist unabhängig von CagT und CagM. Die Immunpräzipitationen mit Antiseren gegen CagX und CagY wurden durchgeführt wie in der Legende zu **Abb.III.2.14** beschrieben, außer dass die angegebenen isogenen Mutanten benutzt wurden. **(A)** Immunpräzipitation (IP) von CagX in der *cagT*- und *cagM*-Mutante. Der Western Blot (WB) mit CagY Antiserum zeigt, dass CagY co-präzipitiert wird. **(B)** Immunpräzipitation (IP) von CagY in der *cagT*- und *cagM*-Mutante. Der Western Blot (WB) mit CagX Antiserum zeigt, dass CagX ebenfalls mit CagY co-präzipitiert wird.

2.8.3 CagM interagiert direkt mit CagT, aber indirekt mit CagY.

Dass Wechselwirkungen zwischen CagT und CagM existieren, wurde schon bei Bestimmung der Stabilisierungseffekte zwischen den essentiellen Apparatskomponenten deutlich. Die *cagM*-Mutante zeigte hier nur eine etwa 60%ige Produktion des CagT-Proteins im Vergleich zum Wildtypstamm P12. Im Stamm 26695 war die Produktion nur etwa 31% gegenüber dem Wildtyp (**Tab.III.2.7, Kapitel III.2.4**). Auch bei einem schon früher durchgeführten *Yeast-Two-Hybrid*-Screen konnte eine schwache Interaktion zwischen den beiden Proteinen ausgemacht werden (Busler *et al.*, 2006). Dies deutete bereits auf eine direkte Interaktion hin. In einer CagM Immunpräzipitation co-präzipitierte CagT ungeachtet des Vorhandenseins von CagX oder CagY, was nahe legt, dass CagM und CagT tatsächlich direkt miteinander interagieren (**Abb.III.2.18B**).

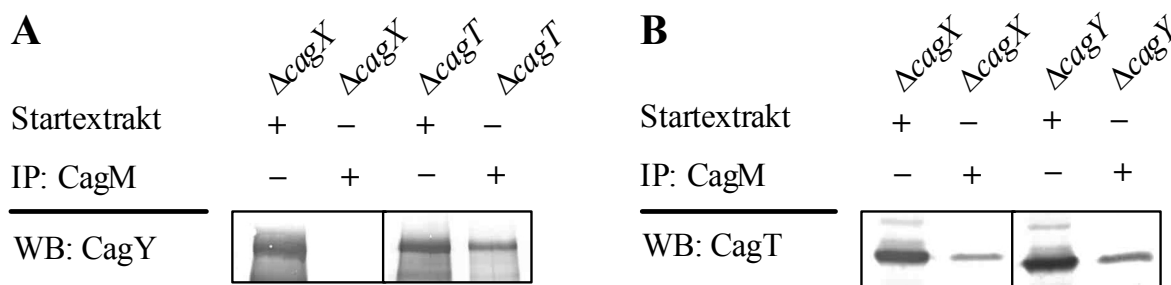


Abb.III.2.18: Die CagM-CagY-Interaktion ist unabhängig von CagT, aber abhängig von CagX. Die CagM-CagT-Interaktion ist unabhängig von CagX und CagY. Die Immunpräzipitationen mit Antiserum gegen CagM wurden durchgeführt wie in der Legende zu **Abb.III.2.14** beschrieben, außer dass die angegebenen isogenen Mutanten benutzt wurden. **(A)** Immunpräzipitation (IP) von CagM in der *cagX*- und *cagT*-Mutante. Der Western Blot (WB) mit CagY-Antiserum zeigt, dass CagY nur in der *cagT*-Mutante co-präzipitiert wird. In der *cagX*-Mutante findet keine Co-Präzipitation von CagY mit CagM statt. **(B)** Immunpräzipitation (IP) von CagM in der *cagX*- und *cagY*-Mutante. Der Western Blot (WB) mit CagT-Antiserum zeigt, dass CagT ebenfalls mit CagM in beiden Mutanten co-präzipitiert wird.

Zwischen CagM und CagY hingegen zeigt sich in den Immunpräzipitationen keine direkte Interaktion. Zwar ist die Interaktion unabhängig von CagT, jedoch wird CagY bei Fehlen von CagX nicht mehr mit CagM co-präzipitiert (**Abb.III.2.18A**).

Daher ist anzunehmen, dass CagM nur über die bereits oben gezeigten CagM-CagX und CagX-CagY Interaktionen interagiert (**Kapitel III.2.8.1 und III.2.8.2**).

Die Co-Präzipitation von CagM mit CagY in den *cagX*- und *cagT*-Mutanten konnte nicht ausgewertet werden, da CagM unspezifisch mit dem CagY-Antiserum präzipitiert wurde (siehe **Abb.III.2.14B, Kapitel. III.2.7**).

2.8.4 CagX und CagY interagieren nur indirekt mit CagT

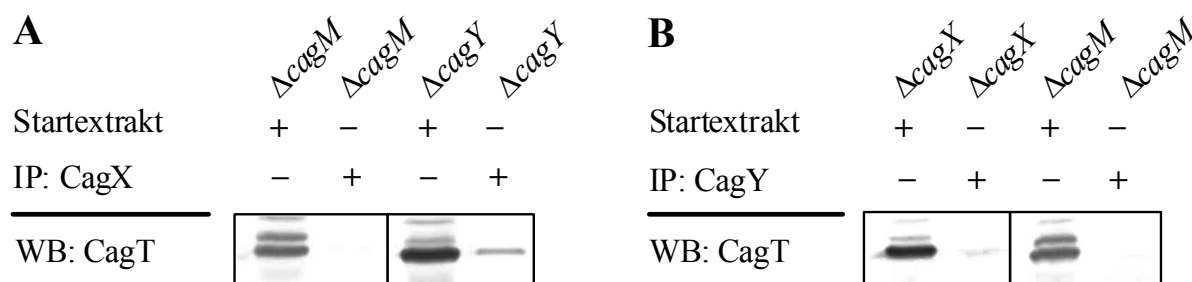


Abb.III.2.19: Die CagX-CagT-Interaktion ist unabhängig von CagY, aber abhängig von CagM. Die CagY-CagT-Interaktion ist abhängig von CagX und CagM. Die Immunpräzipitationen mit Antiseren gegen CagX und CagY wurden durchgeführt wie in der Legende zu **Abb.III.2.14** beschrieben, außer dass die angegebenen isogenen Mutanten benutzt wurden. **(A)** Immunpräzipitation (IP) von CagX in der *cagM*- und *cagY*-Mutante. Der Western Blot (WB) mit CagT-Antiserum zeigt, dass CagT nur in der *cagY*-Mutante co-präzipitiert wird. In der *cagM*-Mutante findet keine Co-Präzipitation von CagT mit CagX statt. **(B)** Immunpräzipitation (IP) von CagY in der *cagX*- und *cagM*-Mutante. Der Western Blot (WB) mit CagT-Antiserum zeigt, dass CagT mit CagY in keiner der beiden Mutanten co-präzipitiert wird.

Die CagT-Präzipitation mit CagX ist abhängig von CagM, aber nicht von CagY (**Abb.III.2.19A**). Dies deutet daraufhin, dass die CagX-CagT-Interaktion durch CagM vermittelt wird. Weiterhin co-präzipitierte CagT nicht mit CagY aus den *cagX*- und *cagM*-Mutanten (**Abb.III.2.19B**), was mit den Beobachtungen übereinstimmt, dass CagT mit CagM direkt interagiert (**Abb.III.2.18B, Kapitel III.2.8.3**) und dass CagM mit CagY über CagX interagiert (**Abb.III.2.18A, Kapitel III.2.8.3**).

Demnach deuten die Experimente der Immunpräzipitationen stark an, dass eine Interaktionskette von CagY über CagX und CagM zu CagT existiert.

3. Studien zum Translokationsmechanismus von CagA

Eine interessante Fragestellung im Bereich der Translokation von CagA in Wirtszellen ist der Mechanismus, wie das Substrat in den Apparat eingeschleust und schließlich in die Wirtszelle transloziert wird. Bei dieser Fragestellung spielen mehrere Aspekte eine wichtige Rolle. Zunächst, welche Komponenten der *cag*-Pathogenitätsinsel sind für den Transport des Substrats CagA über den Apparat in die Wirtszelle verantwortlich? Dann, auf welchem Weg geschieht dies? Gelangt das Effektorprotein beispielsweise von der zytoplasmatischen Seite in den Apparat oder wird es zunächst ins Periplasma exportiert, um von dort in den Apparat eingeschleust zu werden? Schließlich stellt sich die Frage, wie der Sekretionsapparat mit der Wirtszelle auf dessen Oberfläche interagiert und ob Proteine des Sekretionssystems identifiziert werden können, die mit dem möglichen Rezeptor interagieren.

Diese drei Aspekte zum Translokationsmechanismus von CagA sollten im Folgenden untersucht werden.

3.1 Y2H-Interaktionen zwischen CagA, seinen Translokationsfaktoren und Apparatskomponenten

Bereits früher konnte eine funktionelle Klassifizierung der auf der *cag*-Pathogenitätsinsel kodierten Apparatskomponenten erstellt werden (Fischer *et al.*, 2001b). Dabei zeigte sich, dass einige Proteine essentielle Apparatskomponenten darstellen, beispielsweise die VirB-homologen Proteine CagX und CagY, oder auch CagM, das keine Homologien zu Proteinen anderer Sekretionssysteme besitzt. Auf der anderen Seite gibt es Komponenten, die scheinbar nicht Teil des Apparatskomplexes sind, aber eine essentielle Rolle bei der Translokation von CagA spielen. Diese sogenannten Translokationsfaktoren bestehen aus Cag β , dem Kopplungsprotein (entsprechend VirD4 in *A. tumefaciens*), CagI, CagZ und CagF, dem eine Chaperon-ähnliche Funktion im Translokationsprozess zugeschrieben wird (Couturier *et al.*, 2006; Pattis *et al.*, 2007).

Daher stellte sich die Frage, ob Interaktionen zwischen diesen Translokationsfaktoren und essentiellen Apparatskomponenten, untereinander oder auch mit CagA, festgestellt werden können. Diese sollte in dem bereits beschriebenen *Yeast-Two-Hybrid*-System untersucht werden (siehe **Kapitel III.2.4** und **III.2.5**).

In **Tabelle III.2.12 (Kapitel III.2.6.1)** sind alle im *Yeast-Two-Hybrid*-Screen erhaltenen Protein-Interaktionen zwischen den Komponenten der *cag*-Pathogenitätsinsel dargestellt. Die **Abbildungen III.2.13 (Kapitel III.2.6.2)** und **Abb.III.3.1** zeigen die β -Galaktosidase-Werte zur Quantifizierung der einzelnen Interaktionen, auf denen die Klassifizierung der Interaktionen in **Tabelle III.2.12 (Kapitel III.2.6.1)** basiert.

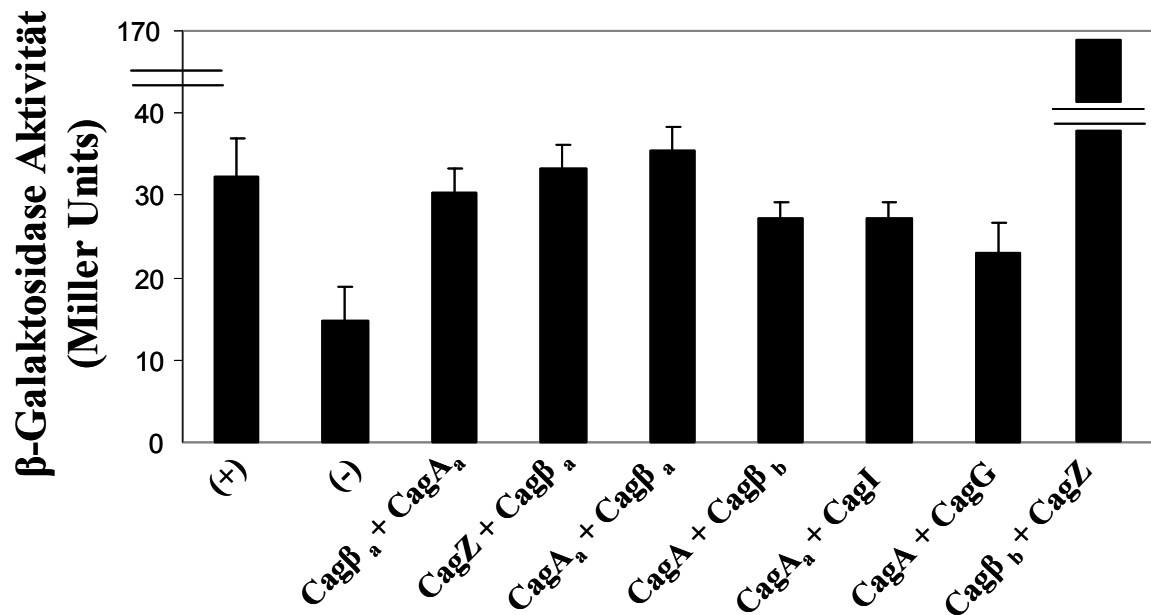


Abb.III.3.1.: Interaktionen zwischen den Translokationsfaktoren untereinander und mit dem Effektorprotein CagA. β-Galaktosidase-Aktivität verschiedener Interaktionen, die im *Yeast-Two-Hybrid*-System erhalten wurden. Diploide Hefezellen, die die angegebenen Plasmidpaare enthielten (angegeben als *bait* + *prey*-Plasmid) und auf Dreifachselektiv-Medium (SD-Medium ohne Leucin, Tryptophan und Histidin) wuchsen, wurden zusammen mit Hefen, die die Positivkontroll (+)- und Negativkontroll-Plasmide (-) enthielten, auf β-Galaktosidase-Aktivität überprüft (siehe **Kapitel II.2.2.7**). Die gezeigten Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten einschließlich der Standardabweichungen. Die gezeigten Aktivitäten wurden, wie in **Tabelle III.2.12 (Kapitel III.2.6.1)** gezeigt, in drei Kategorien klassifiziert. Der Balken für die Interaktion Cagβ_b+CagZ ist der Übersichtlichkeit halber nicht vollständig dargestellt (Exakter Wert 164 ± 21,6 Miller Units).

Zahlreiche Interaktionen zeigten sich zwischen CagA, seinen Translokationsfaktoren und den Apparatskomponenten im *Yeast-Two-Hybrid* Screen (**Tabelle III.2.12, Kapitel III.2.6.1**). Die periplasmatische Schleife des Kopplungsproteins Cagβ, Cagβ_a, interagiert mit den Apparatskomponenten CagY_c, CagT, CagL und CagH, sowie mit der für die CagA Translokation ganz essentiellen Komponente CagZ. Der zytoplasmatische Teil von Cagβ_b interagiert ebenfalls stark mit CagZ. Diese Interaktion wurde auch in einem anderen *Yeast-Two-Hybrid*-Assay beschrieben (Busler *et al.*, 2006) und konnte mittlerweile mit GST-*Pulldown*-Assays bestätigt werden (A. Jurik & W. Fischer, unveröffentlicht). Ebenfalls konnte dabei die hier gefundene Interaktion zwischen Cagβ und CagA durch andere Methoden gezeigt werden.

Die durch *Pulldown*-Assays und Immunpräzipitationen bereits beschriebene Interaktion zwischen CagF und CagA (Couturier *et al.* 2006; Pattis *et al.*, 2007) konnte hier erneut bestätigt werden. Außerdem fanden sich Interaktionen von CagF mit den Apparatskomponenten CagX und dem zytoplasmatischen Teil von CagY_a. CagI zeigte auch eine Interaktion mit CagA.

Somit wurden Interaktionen zwischen CagA und drei Translokationsfaktoren (Cagβ, CagI und CagF) erhalten. Außerdem interagiert CagA mit den Apparatskomponenten CagU, CagY_c und der teilweise essentiellen Komponente CagG. Auch eine Interaktion innerhalb des CagA-Proteins zwischen N-terminaler und C-terminaler Hälfte konnte festgestellt werden.

Da zahlreiche Interaktionen von CagA mit voraussichtlich periplasmatisch lokalisierten Proteinen (CagI, CagG) bzw. ins Periplasma ragenden Domänen innerer Membranproteine (Cag β_a , Cag β_b , CagY $_c$) gefunden wurden, stellte sich die Frage, ob CagA im Zuge des Translokationsprozesses einen periplasmatischen Zustand hat. Da es keine N-terminale, Sec-abhängige Signalsequenz besitzt, könnte diese Funktion durch Komponenten des Sekretionsapparats, möglicherweise einem der Translokationsfaktoren, übernommen werden. Deshalb sollte im nächsten Schritt eine mögliche Lokalisierung von CagA im Periplasma untersucht werden.

3.2 Periplasma-Lokalisierung von CagA

Es ist bisher bei (allen) Typ IV-Sekretionssystemen unklar, ob der Apparat eine Art Kanal bildet, der beide bakteriellen Membranen durchspannt und durch dessen Lumen die Substrate ins extrazelluläre Medium sekretiert oder die Wirtszelle transloziert werden (Kanalmodell). Oder ob das Substrat in den Apparat eingeführt wird und durch dynamisches Strecken des Pilus transportiert wird (Kolbenmodell, siehe **Kapitel I.2.4**). Bei beiden Modellen ist noch unklar, wie das Substrat in den Apparat eingeschleust wird. Beim ersten Modell bestehen mehrere Möglichkeiten, dass das Substrat von der zytoplasmatischen Seite in den Kanal eintritt, oder dass es, vermittelt z.B. durch das Sec-System oder möglicherweise das Kopplungsprotein, fungierend als Translokase, zunächst ins Periplasma exportiert und dann in den Sekretionsapparat eingeführt wird. Letztere Möglichkeit ist sehr wahrscheinlich für das Kolbenmodell (Cascales and Christie, 2003). Demnach könnte eine periplasmatische Lokalisierung des Substrats Aufschluß über den Translokationsmechanismus geben.

In diesem Versuchsteil sollte nun das Substrat des Cag-Typ IV-Sekretionssystems, CagA, auf eine mögliche Periplasma-Lokalisierung hin, untersucht werden. Da bislang keine Methode zur Gewinnung einer reinen Periplasma-Fraktion bei *H. pylori* etabliert werden konnte, sollte untersucht werden, ob periplasmatisch-lokalisierte Proteine spezifisch markiert und auf diesem Wege nachgewiesen werden können. Dazu wird auf die Zugänglichkeit von natürlichen bzw. künstlich eingeführten Cysteinresten in Proteinen für alkylierende Reagenzien getestet. Die Cysteinreste können dabei mit einem Biotinylierungsreagenz (MPB) markiert werden, wenn sich das Protein außerhalb des Zytoplasmas befindet. Gleichzeitig können vor der Markierung diese Cysteinreste mit einem Reagenz (AMS) blockiert werden, wenn sie sich auf der Zelloberfläche befinden. Proteine, die sich im Periplasma befinden, können aber weiterhin markiert werden, da das Blockierungsreagenz AMS nur an der Zelloberfläche wirkt, nicht aber ins Periplasma eindringen kann. Proteine, die sich im Zytoplasma befinden, werden nicht markiert, da das Markierungsreagenz nur über die äußere, nicht aber über die innere Membran gelangt (Bayliss *et al.*, 2007).

Die Methode wurde wie in **Kapitel II.2.5.7** beschrieben nach Bogdanov *et al.*, 2002 und Wang *et al.*, 2002. durchgeführt. Die Analyse der Markierung erfolgt im Western Blot mit entsprechenden Antiseren gegen das gewünschte Protein bzw. mit einer an Streptavidin-gekoppelten Peroxidase zum Nachweis der Biotin-Markierung.

CagA besitzt C-terminal an Position 1164 (von 1186 Aminosäuren) ein einzelnes Cystein. Als Kontrollproteine dienten zum einen BabA (Cysteine an Aminosäurepositionen 126, 155, 209, 217, 286, 310, 407 und 435 von 733), ein Protein der äußeren Membran von *H. pylori* (Ilver *et al.*, 1998; Tomb *et al.*, 1997), und das CagA-Protein (Cysteine an Positionen 48, 86, 87, 176, 231, 235, 261, 321 von 329), das zytoplasmatisch und an der Innenseite der Zytoplasmamembran vorliegt (siehe **Kapitel III.2.2**, **Abb.III.2.4**).

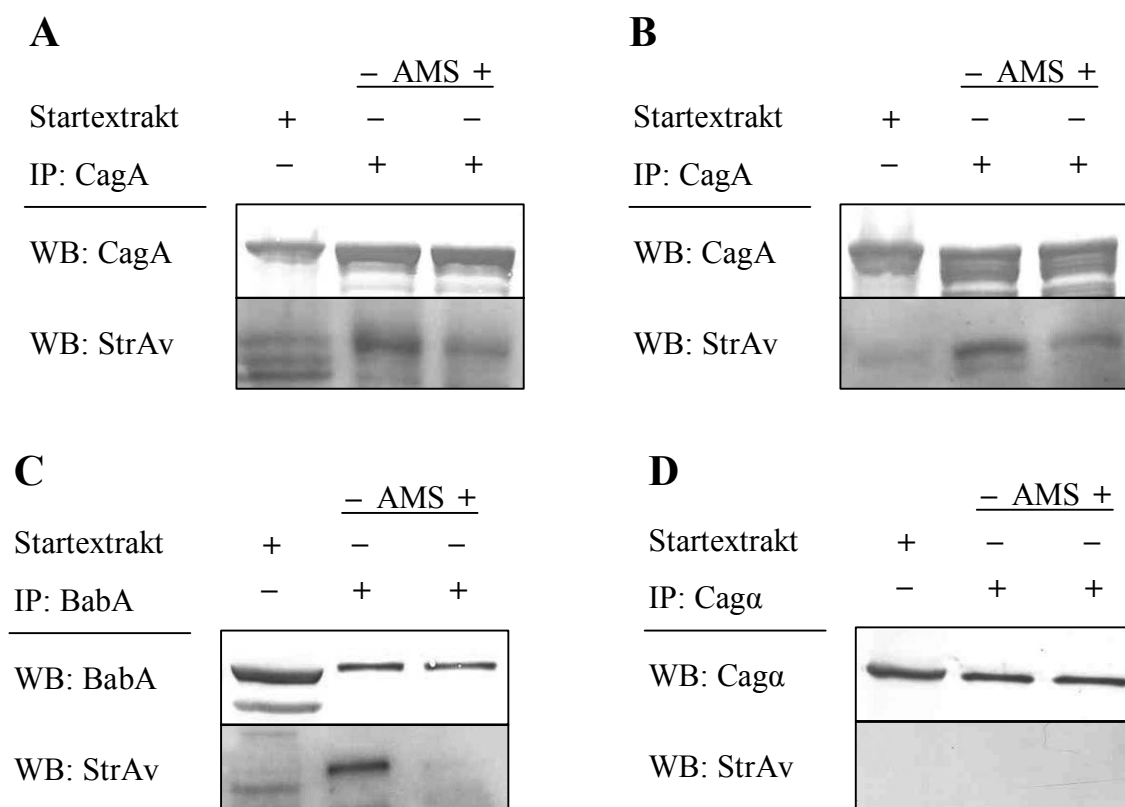


Abb III.3.2: Test auf die Zugänglichkeit freier Cysteine zur Bestimmung einer möglichen Periplasma-Lokalisierung von CagA. 26695 Wildtyp *H. pylori* Zellen wurden in zwei Ansätzen angelegt. Ein Ansatz wurde zunächst mit AMS (5mM Endkonzentration) behandelt (+ AMS), wodurch freie Cysteinreste blockiert wurden. Der vorbehandelte und der unbehandelte Ansatz (- AMS) wurden dann mit MPB-Reagenz (100µM Endkonz.) inkubiert, wodurch freie Cysteinreste auf der Zelloberfläche und im Periplasma, biotinyliert werden. Nach Abstoppen der Reaktion mit β -Mercaptoethanol (20mM Endkonzentration) wurden die Zellen per Ultraschall aufgebrochen und die entsprechenden Proteine immunpräzipitiert. Der Nachweis der markierten Proteine erfolgte im Western Blot mit entsprechenden Antisera gegen CagA, BabA, Cagα oder Peroxidase-gekoppeltem Streptavidin zum Nachweis der Biotinylierung. **(A)** Markierung von CagA aus 26695 Wildtypzellen von Serumplatten. **(B)** Markierung von CagA aus 26695 Wildtypzellen aus Flüssigkulturen (Brucella-Medium+10%FCS). **(C)** Markierung von BabA aus 26695 Wildtypzellen von Serumplatten. **(D)** Markierung von Cagα aus 26695 Wildtypzellen von Serumplatten. IP, Immunpräzipitation; WB, Western Blot; StrAv, Streptavidin-Pox.

Zunächst lässt sich festhalten, dass alle untersuchten Proteine, CagA, BabA und Cagα, unter den Markierungsbedingungen präzipitiert werden können (siehe **Abb.III.3.2**, Western Blots CagA, BabA, Cagα). CagA wird in 26695 Wildtypzellen von Serumplatten markiert (**Abb.III.3.2A**, Western Blot StrAv, -AMS). Die Markierung fällt etwas schwächer aus, wenn man vorher die Cysteine mit AMS blockiert (**Abb.III.3.2A**, Western Blot StrAv, +AMS). Die Bande in der nicht-blockierten Probe repräsentiert das gesamte CagA, das sich auf der Zelloberfläche (möglicherweise auf dem Pilus) befindet und CagA, das sich im Periplasma befindet. Die schwächere Bande bei vorheriger Blockierung repräsentiert den Anteil von CagA im Periplasma, während der Anteil auf der Oberfläche in diesem Ansatz verschwindet, da die Cysteine durch die Blockierung nicht mehr markiert werden können.

Um Artefakte auszuschließen, die aus lysierten Zellen auf der Platte resultieren und aus denen CagA auf die Oberfläche noch lebender Zellen gelangt, wurden die Ansätze mit

Flüssigkulturen durchgeführt. Hier sollten vor Allem weniger tote Zellen in den Versuchsansätzen sein und damit auch die unspezifische Anhaftung von CagA an der Oberfläche lebender Zellen bei Lyse toter Zellen gegenüber Agarplatten reduziert sein. Diese Ansätze sind repräsentativ in **Abb.III.3.2B** dargestellt. Allerdings wurden in diesen Ansätzen ähnliche Resultate erzielt, wie in den Ansätzen mit Bakterien von Serumplatten. Man sieht eine deutliche CagA-Markierung im Ansatz ohne Blockierung und diese Markierung wird schwächer, wenn vorher das Blockierungsreagenz AMS zugegeben worden war. Somit scheint der Anteil an CagA, der durch die Lyse benachbarter Zellen auf die Oberfläche noch lebender gelangt, vernachlässigbar zu sein.

Diese Experimente zeigen, dass CagA außerhalb des Zytoplasmas nachweisbar ist. Ein Teil könnte periplasmatisch lokalisiert sein (**Abb.III.3.2A, B**; Ansätze +AMS), aber es findet sich möglicherweise auch ein oberflächenassoziiertes Anteil (**Abb.III.3.2A, B**; Unterschied in Bandenintensität mit und ohne AMS).

Das in der äußeren Membran lokalisierte BabA-Protein kann durch MPB markiert werden, jedoch kann diese Markierung durch vorherige Blockierung mit AMS vollständig verhindert werden (**Abb.III.3.2C**). Hier zeigt sich also wie erwartet, dass BabA oberflächenassoziiert und nicht im Periplasma lokalisiert ist. Andersherum verhält es sich mit Cag α , das zytoplasmatisch an der inneren Membran vorliegt. Hier sollte keine Markierung zu finden sein, da weder das Markierungsreagenz, noch das Blockierungsreagenz diese Membran passieren kann. Dies zeigt sich auch im Western Blot (**Abb.III.3.2D**). Es findet in beiden Ansätzen keine Biotinylierung des Proteins statt. Die Ergebnisse dieser beiden unterschiedlich lokalisierten Proteine stützen die Ergebnisse für das CagA-Protein, dass eine mögliche Periplasmalokalisierung und eine teilweise Oberflächenassoziation dieses Effektorproteins vorliegt. Letztere wurde auch schon in Fluoreszenzmarkierungs-Versuchen (L. Jimenez, X. Sewald, unveröffentlicht) und in elektronenmikroskopischen Aufnahmen gezeigt (Kwok *et al.*, 2007).

Es bleibt zu klären ob diese Lokalisierungen abhängig von Komponenten des Cag-Typ IV-Sekretionsapparats, z.B. des Kopplungsproteins Cag β , sind. Mit diesem Assay konnte eine solche Abhängigkeit noch nicht gezeigt werden. Die Markierungsmuster in Mutanten essentieller Apparatskomponenten ($\Delta cagX$, $\Delta cagY$ oder $\Delta cagT$) oder in Mutanten der Translokationsfaktoren ($\Delta cag\beta$, $\Delta cagF$) unterschieden sich nicht signifikant von denen des Wildtyps (Daten nicht gezeigt).

3.3 Interaktionen von *cag*-PAI-Apparatskomponenten mit Rezeptoren auf der Wirtszelloberfläche

Es konnte bereits in anderen Studien gezeigt werden, dass *H. pylori* das bakterielle Effektorprotein CagA über das Cag-Typ IV-Sekretionssystem in eine Vielzahl verschiedener Zelltypen *in vitro* translozieren kann (Bauer *et al.*, 2005). Nimmt man die Tyrosin-Phosphorylierung als Nachweis für die CagA-Translokation, so zeigen sich einige Zelllinien resistent gegenüber dem Transfer von CagA. Dies wurde dem Beitrag von notwendigen Wirtsfaktoren für eine effiziente Translokation von CagA durch das Typ IV-Sekretionssystem zugeschrieben (Bauer *et al.*, 2005). Kürzlich wurde berichtet, dass β_1 -Integrine, Rezeptoren zur Zelladhäsion auf der Oberfläche verschiedener Wirtszelltypen eine essentielle Rolle in der Typ IV-System-vermittelten Translokation von CagA spielen. Bei Zellen, denen β_1 -Integrin fehlt, findet keine Translokation von CagA statt. Werden diese Zellen mit der humanen β_1 -Integrin-Untereinheit komplementiert, so ist auch die CagA-Translokation wieder hergestellt (L. Jimenez *et al.*, unveröffentlicht; Kwok *et al.*, 2007). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine essentielle Komponente des Sekretionsapparats, das CagL-Protein, mithilfe seines RGD-Motifs eine funktionelle Rolle bei dieser Wechselwirkung spielt (Kwok *et al.*, 2007).

Um zu bestimmen, welche weiteren Komponenten des oberflächen-assoziierten Cag-Typ IV-Sekretionsapparats möglicherweise noch mit β_1 -Integrin interagieren, wurde ein *Yeast-Two-Hybrid*-Screen, wie unter **Kapitel III.2.5** beschrieben, zwischen den *cag*-PAI-kodierten Proteinen und der extrazellulären Domäne (Aminosäuren 1-728) der humanen β_1 -Integrin-Untereinheit durchgeführt. Dabei wurden Interaktionen zwischen dem β_1 -Integrin und den Proteinen CagY, CagI und CagA gefunden. Diese Interaktionen wurden mithilfe von Verdünnungsreihen (siehe **Kapitel II.2.2.6**) weiter untersucht und verifiziert. In diese Versuchsreihe wurden nicht nur die bereits im Hauptscreen gefundenen interagierenden Proteine miteinbezogen, sondern alle vorhandenen Konstrukte mit Proteinvarianten. Dabei repräsentierten CagY_a, CagY_b und CagY_c, das CagY-Protein, CagA wurde in zwei Hälften geteilt, CagA_a und CagA_b, und das CagI-Protein ohne seine N-terminale Signalsequenz (siehe auch **Tab.III.2.8**).

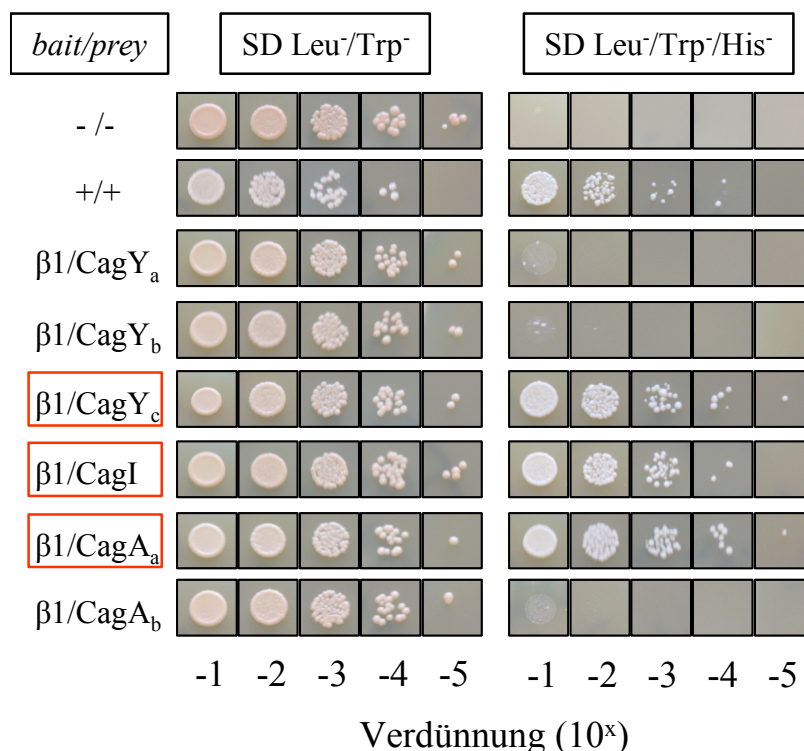


Abb.III.3.3: Yeast-Two-Hybrid-Screen zur Identifizierung interagierender Proteine des *H. pylori* Cag-Typ IV-Sekretionssystems mit der extrazellulären Domäne des humanen β_1 -Integrins. Diploide Hefezellen mit den zu untersuchenden *bait/prey*-Kombinationen wurden auf OD₆₆₀ = 0,26 eingestellt und in Verdünnungsreihen (10⁻¹–10⁻⁵) auf Wachstum untersucht. Wachstum auf Doppelselektivmedium (SD Leu⁻/Trp⁻) diente zur Kontrolle der Lebensfähigkeit der Zellen, während Wachstum auf Dreifachselektivmedium (SD Leu⁻/Trp⁻/His⁻) Proteininteraktionen anzeigte. Interaktionen mit β_1 -Integrin konnten für drei Komponenten der *cag*-PAI festgestellt werden: die N-terminale Region von CagA (CagA_a), der C-terminale Bereich von CagY (CagY_a) und das CagI-Protein (angezeigt durch rote Umrandung).

Von den in den Verdünnungsreihen getesteten sechs *bait*-Proteinen interagierten drei spezifisch mit dem β_1 -Integrin (Abb.III.3.3). Diese waren die N-terminale Hälfte von CagA (CagA_a), die C-terminale Region von CagY (CagY_c) und das CagI-Protein. Alle anderen Proteinvarianten zeigten nur Wachstum auf den SD Leu⁻/Trp⁻-Platten, was zeigte, dass die Hefezellen zwar lebens- und wachstumsfähig waren, nicht aber auf dem Dreifachselektivmedium, weshalb hier keine Interaktionen vorlagen.

Somit konnten in dem *Yeast-Two-Hybrid*-Assay drei weitere Proteine der *cag*-Pathogenitätsinsel als mögliche Interaktionspartner für β_1 -Integrin gefunden werden. Durch *Pulldown*-Experimente mit an magnetische Kügelchen gekoppeltes β_1 -Integrin konnten die Interaktionen mit dem translozierten Effektorprotein CagA und der VirB10-homologen, oberflächen-assoziierten Komponente des Sekretionssystems, CagY, bestätigt werden (L. Jimenez *et al.*, unveröffentlicht).

IV Diskussion

1. Interaktionen der *cag*-Pathogenitätsinsel mit dem Chromosom

Typ IV-Sekretionssysteme erscheinen als distinkte Einheiten im Chromosom, liegen sie doch oftmals als Pathogenitätsinseln vor oder sind auf Plasmiden kodiert wie im Falle des VirB-Systems von *A. tumefaciens*. Dennoch spielen auch chromosomale Faktoren eine Rolle im Translokationsprozess. Beim VirB-System beispielsweise werden auch die chromosomal kodierten, periplasmatischen Proteine VirJ und AcvB zum Transfer der Substrate benötigt (Cascales and Christie, 2003). Von daher erschien es interessant, die *cag*-Pathogenitätsinsel auf weitere Interaktionen mit chromosomal kodierten Proteinen zu untersuchen. Besonders vielversprechend erschien hierbei die Region stromaufwärts der Pathogenitätsinsel, angefangen mit den beiden Genen *hp496* und *hp511*. Für HP496 konnte bereits eine Interaktion mit CagA in einem genomweiten Screen auf Proteininteraktionen in *H. pylori* gefunden werden (Rain *et al.*, 2001). Diese Interaktion wurde ebenfalls biochemisch bestätigt (Terradot *et al.*, 2004). Das Gen *hp511* liegt durch genetische Rearrangements in verschiedenen Stämmen (Du52:2 und ATCC43504) auf der Pathogenitätsinsel lokalisiert, stromaufwärts neben dem *cagA*-Gen (Blomstergren *et al.*, 2004). Es könnte so unter die Regulation der *cag*-PAI fallen und eine wichtige Rolle bei der Funktion dieses Virulenzfaktors spielen, zumal es auch eine typische Signalsequenz für Lipoproteine besitzt (Tomb *et al.*, 1997), die eine wichtige Rolle in Typ IV-Sekretionssystemen einnehmen, wie beispielsweise VirB7 im VirB-System von *A. tumefaciens*. Außerdem wurde es als ein verstärkender Faktor der Ureaseaktivität identifiziert und somit mit einem Virulenzfaktor assoziiert gefunden (McGee *et al.*, 1999). Betrachtet man die Gene stromaufwärts von *hp511*, so fallen weitere durch interessante Eigenschaften auf. Das Gen *hp513* wurde ebenfalls in dem erwähnten genomweiten Screen als Interaktionspartner von CagA, einer der energieliefernden ATPasen des Sekretionssystems, identifiziert (Rain *et al.*, 2001). Die Gene *hp515* und *hp516* zeigen signifikante Ähnlichkeit zur HslVU Protease in *E. coli*. Diese gehört zu ATP-abhängigen Proteasen, die ebenfalls virulenz-assoziiert beobachtet werden. Sie treten bei der Regulation von Typ III-Sekretionssystemen und Invasionsproteinen in gramnegativen Bakterien wie Yersinien (Jackson *et al.*, 2004; Miller and Falkow, 1988; Pederson *et al.*, 1997) oder Salmonellen (Takaya *et al.*, 2002; Boddicker and Jones, 2004) auf. Auch bei grampositiven Erregern wie Listerien (Gaillot *et al.*, 2000; Nair *et al.*, 2000) oder *Staphylococcus aureus* (Frees *et al.*, 2003; Frees *et al.*, 2005), sind sie mit der Regulation von sekretierten Virulenzfaktoren verknüpft (Butler *et al.*, 2006). Bei *Campylobacter jejuni*, einem nahen Verwandten von *H. pylori*, konnte ein Einfluß von ATP-abhängigen Proteasen auf die Virulenz festgestellt werden. Mutanten in den Proteasen zeigten hier eine reduzierte Invasion in Epithelzellen (Cohn *et al.*, 2007). Kürzlich wurde auch beobachtet, dass das HslVU-Hitzeschock-Protease-Chaperonpaar für die Degradierung von TraJ, dem F-Plasmid Transfer-Aktivator, verantwortlich ist. Durch den Abbau von TraJ wird die Synthese des F-Konjugationsapparats, eines komplexen, membrandurchspannenden Typ IV-Sekretionssystems kontrolliert (Lau-Wong *et al.*, 2008).

Ein weiteres interessantes Gen dieser Region vor der *cag*-Pathogenitätsinsel ist das Gen *hp517*, das bei der Genomsequenzierung des Stammes 26695 mit Ähnlichkeit zu Era (*E. coli* Ras-like protein) identifiziert wurde (Tomb *et al.*, 1997). Era ist ein kleines G-Protein in *E. coli*, das durch Ähnlichkeit zum Ras-Protein identifiziert wurde. Obwohl seine genaue Funktion noch unklar ist, konnte gezeigt werden, dass es die 16SrRNA und die 30S-

Untereinheit der Ribosomen bindet und so wird eine Rolle bei der Proteinsynthese und der Ribosomenbiogenese vermutet (Sayed *et al.*, 1999; Inoue *et al.*, 2006). Obwohl viele GTP-bindende Homologe der eukaryontischen Ras-Superfamilie quer durch das Bakterienreich identifiziert wurden (Dong *et al.*, 2007), bleibt die Funktion dieser Proteine bisher unklar. Nachdem die Ras-Familie Rollen in verschiedensten zellulären Prozessen wie dem Vesikeltransport, der Regulation des Zellkerns oder der Reorganisation des Zytoskeletts, innehat und mit der spezifischen Kompartimentierung der Eukaryontenzelle einhergehen, bleibt eine interessante Frage, was die Rolle der homologen Proteine in nicht-kompartimentierten Bakterienzellen darstellt. Das einzige bisher identifizierte Ras-ähnliche Protein mit einer analogen Funktion ist das MglA-Protein in *Myxococcus xanthus* (Hartzell, 1997; Leipe *et al.*, 2002), das eine wichtige Rolle bei der gleitenden Beweglichkeit der Bakterien spielt (Stephens *et al.*, 1989; Kaiser, 2008).

Schließlich gehört das Gen direkt vor der *cag*-PAI, *hp519*, zur Gruppe von Proteinen, die sogenannte Sell-ähnliche Sequenzwiederholungen (SLR) besitzen (Ponting *et al.*, 1999, Schultz *et al.*, 1998), die nach dem *sell*-Gen (sel: *suppressor-enhancer of lin*) von *Caenorhabditis elegans* benannt wurden (Grant and Greenwald, 1996). SLR Proteine kommen in Bakterien und Eukaryonten vor und man vermutet, dass sie auch ähnliche biologische Funktionen besitzen und sogar in ähnlichen Signaltransduktionswegen involviert sein könnten (Ponting *et al.*, 1999; Ponting, 2000). Obwohl SLR-Proteine verschiedene zelluläre Funktionen besitzen, scheinen sie doch alle als Adaptorproteine für den Aufbau membran-gebundener, makromolekularer, Komplexe zu dienen (Mittl and Schneider-Brachert, 2007). Die bakteriellen Proteine dieser Familie sollen Interaktionen zwischen bakteriellen und eukaryontischen Wirtszellen vermitteln und eine Anpassung an verschiedene eukaryontische Wirte darstellen. Beispielsweise sind LpnH und EnhC verantwortlich für den Eintritt von *Legionella pneumophila* in Epithelzellen und Makrophagen (Cirillo *et al.*, 2000; Newton *et al.*, 2006). Es wird vermutet, dass EnhC entweder direkt mit einem Rezeptor auf der Zielzelle interagiert oder die Verfügbarkeit von Rezeptoren in einer ähnlichen Weise wie Sell reguliert (Cirillo *et al.*, 2000). Allerdings bleibt noch zu zeigen, ob diese beiden Proteine bakterielle oder eukaryontische Rezeptoren erkennen. Eine ähnliche Funktion wird für HP519 diskutiert, das aufgrund positiv selektionierter Eigenschaften auf Sequenzebene einen möglichen Faktor zur Anpassung von *H. pylori* an verschiedene Wirte darstellen könnte (Ogura *et al.*, 2007). Genauer ist über die Funktion dieses Proteins noch nicht bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurden Mutanten in den oben angesprochenen Genen aus dem Genbereich vor der *cag*-Pathogenitätsinsel (*hp496-hp519*) in den Stämmen 26695 bzw. P12 hergestellt. Die Mutanten $\Delta hp496$ und $\Delta hp511$ wurden als Deletionsmutanten angelegt, wobei das entsprechende Gen durch eine Chloramphenicol-Resistenzgenkassette ersetzt wurde. Bei den Mutanten in den Genen *hp513*, *hp515*, *hp516*, *hp517*, *hp518* und *hp519* wurde das Gen jeweils durch eine Insertion des Transposons TnMax5 unterbrochen und dadurch ausgeschaltet. Verschiedene Assays zur Untersuchung der Translokationsfähigkeit des Effektorproteins CagA und der Intaktheit und Funktionalität des Cag-Typ IV-Sekretionsapparats sollten Hinweise auf die möglichen Effekte und eine eventuelle Rolle des jeweiligen Gens in der Pathogenese geben. Die Translokation von CagA wurde an seinem Phosphorylierungsstatus in den Zielzellen gemessen, was auch schon Aufschluß über die Funktionsfähigkeit des Sekretionsapparats gibt. Die Auslösung der *hummingbird*- und *scattering*-Phänotypen zeigt die zellulären Effekte von CagA und anderer involvierter Faktoren in der Virulenz von *H. pylori*. Schließlich wird durch Bindung eines

funktionsfähigen Sekretionsapparats eine proinflammatorische Immunantwort der Wirtszellen ausgelöst, die sich in einer IL-8 Induktion äußert und in den jeweiligen Mutanten gemessen wurde.

Zunächst lässt sich festhalten, dass die CagA-Produktion in allen Mutanten unter Infektionsbedingungen gleich dem Wildtyp 26695 bzw. P12 ist. Es findet sich auch kein Unterschied bei der Infektion verschiedener Zelltypen wie an AGS-Zellen oder J774.1 Makrophagen getestet wurde. Auch findet unvermindert gegenüber dem Wildtyp eine Translokation von CagA statt, wie die Phosphotyrosinblots der jeweiligen Infektionen belegen. So findet man in allen Mutanten eine Bande phosphoryliertem CagAs, die in den Wildtypinfektionen auch auftritt, nicht aber in Mutanten, die z.B. einen defekten Sekretionsapparat besitzen. Von daher kann von keinem Einfluß eines der untersuchten Gene auf die Translokation von CagA ausgegangen werden. Betrachtet man die zellulären Effekte in der Wirtszelle nach Translokation von CagA, so finden sich auch keine Unterschiede zum jeweiligen Wildtyp. Der untersuchte *hummingbird*-Phänotyp wird in allen Mutanten ausgelöst und in der Morphologie zeigt sich kein Unterschied zu einer Wildtyp-Infektion. Die zellulären Effekte in Wirtszellen bei einer Infektion mit *H. pylori* sind sehr vielfältig. Daher ist eine genauere Untersuchung dieser Signalwege nötig, um die Rolle eines bestimmten Gens bei diesen Effekten während der *H. pylori*-Infektion zu bestimmen. Die hier untersuchten Assays lassen keine Rückschlüsse auf mögliche Effekte eines der untersuchten Gene zu. Zwar waren die IL-8 Werte in der *hp517*-Mutante um etwa 20% gegenüber dem Wildtyp erhöht, allerdings liegen sie damit in der natürlichen Schwankungsbreite dieses Assays, wie man sie auch bei Mutanten in Genen der *cag*-Pathogenitätsinsel findet (Fischer *et al.*, 2001b). Auch scheint diesem Gen eine andere Rolle zuzukommen wie seinem Homologen Era, das eine essentielle Funktion in *E. coli* besitzt und bei Verlust letal ist (Sayed *et al.*, 1999). Die *hp517*-Mutante in *H. pylori* zeigte in dieser Hinsicht keine Defekte und zeigte sich auch sonst im physiologischen Verhalten wie der Wildtyp.

Die Vermutung, dass *hp511*, das als Lipoprotein vorhergesagt wurde (Tomb *et al.*, 1997), das mögliche VirB7-Homologe im Cag-Typ IV-Sekretionssystem darstellen könnte, nachdem es sich in einigen klinischen Isolaten durch genetische Rearrangements auf der *cag*-PAI lokalisiert findet (Blomstergren *et al.*, 2004), konnte durch die Untersuchungen in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Die Δ *hp511*-Mutante zeigte keinerlei Effekte auf die CagA-Translokation und die IL-8 Induktion und scheint somit keine essentielle Apparatskomponente darzustellen. Im Gegensatz dazu zeigt eine Mutante im *cagT*-Gen (*hp532*) keine Translokation von CagA und auch keine Induktion mehr von IL-8 (Fischer *et al.*, 2001b). Somit kann die VirB7-homologe Funktion von CagT durch *hp511* auch nicht kompensiert werden. In dieser Arbeit konnte CagT, wie bereits schon früher festgestellt (Fischer *et al.*, 2001b), als VirB7-Homolog bestätigt werden, nachdem es in einem Proteinkomplex des Cag-Sekretionsapparats in der äußeren Membran von *H. pylori* nachgewiesen werden konnte und in diesem Komplex auch ähnlich wie im VirB-System von *Agrobacterium tumefaciens* mit dem VirB9-homologen Protein CagX (HP528) interagierte. Allerdings lassen sich durch die hier durchgeführten Untersuchungen regulatorische Funktionen von *hp511* auf Gene der *cag*-Pathogenitätsinsel nicht ausschließen. In einem Screen einer Genbibliothek von *H. pylori* zur Isolierung Urease-modulierender Gene wurde *hp511* als Urease-verstärkender Faktor identifiziert. Dies deutet auf eine Beteiligung an der Regulation virulenz-assoziiierter Gene hin (McGee *et al.*, 1999). Allerdings ist noch nicht viel über die Regulation der Genexpression der *cag*-Pathogenitätsinsel bekannt. In einer Studie wurde berichtet, dass einige Gene der *cag*-PAI *in vitro* unter sauren Bedingungen

hochreguliert waren (Wen *et al.*, 2003), während andere Studien keine signifikanten Induktionen fanden (Merrell *et al.*, 2003; Bury-Moné *et al.*, 2004). Auch wurden noch keine beweiskräftigen Daten bezüglich der Säureregulation des *cagA*-Gens selbst erhalten (Karita *et al.*, 1996; Merrell *et al.*, 2003; Barnard *et al.*, 2004). Allerdings scheint die *cagA*-Transkription zwischen logarithmischer und stationärer Phase hochreguliert zu sein (Thompson *et al.*, 2003; Boonjakuakul *et al.*, 2005) und könnte auch von der Salzkonzentration abhängen (Loh *et al.*, 2007). Die Expression von CagA könnte von dem globalen Regulator CsrA beeinflusst sein (Barnard *et al.*, 2004), aber sie ist nicht durch das auf Säure ansprechende ArsRS Zwei-Komponentensystem reguliert (Pflock *et al.*, 2006). Einige Gene der *cag*-Pathogenitätsinsel werden auch während der Infektion von Rhesus Makaken oder mongolischen Gerbils induziert (Boonjakuakul *et al.*, 2005, Scott *et al.*, 2007). Dies deutet auf eine Regulation der *cag*-PAI und möglicherweise anderer Virulenzgene unter spezifischen Umweltbedingungen oder in bestimmten Wachstumsphasen hin. In besagter *in vitro* Studie unter sauren Bedingungen fand sich das Gen für das GTP-bindende Ras-Homolog, *hp517*, um mehr als das Zweifache runterreguliert (Wen *et al.*, 2003). Auch zeigte sich die Expression ATP-abhängiger Proteasen wachstumsabhängig. Beispielsweise wurde die Expression der Protease ClpB während dem Übergang der logarithmischen in die stationäre Phase induziert (Thompson, *et al.*, 2003). Da die HslVU-Protease, kodiert von den Genen *hp515* und *hp516*, ebenfalls zur Familie der ATP-abhängigen Protease gehört, könnte auch hier eine Regulation nach Wachstumsphase oder Umweltbedingungen vorhanden sein, die mit den durchgeführten Assays nicht ermittelt werden konnte. Ebenso ist eine Zelltyp-spezifische Funktion der untersuchten Gene möglich. Dies könnte beispielsweise bei dem SLR-Protein HP519 eine Rolle spielen, das durch seine hohe allelische Diversität, gerade in geographisch und ethnischer Hinsicht, eine spezifische Anpassung von *H. pylori* an verschiedene Wirte darstellt (Ogura *et al.*, 2007) und somit mit den in den Experimenten eingesetzten Zelltypen nicht bestimmbar ist.

In einem genomweiten *Yeast-Two-Hybrid*-Screen interagierender Proteine in *H. pylori* wurden verschiedene Interaktionen von chromosomal kodierten Proteinen mit Proteinen des Cag-Typ IV-Sekretionssystems gefunden (Rain *et al.*, 2001). Die Interaktionen zwischen HP496 mit CagA und HP1451 mit Cag α konnten bereits experimentell bestätigt werden (Terradot *et al.*, 2004). Weiterhin konnte die letztgenannte Interaktion auch durch *Pulldown*-Experimente aus Bakterienzellen *in vivo* gezeigt werden und die Kristallstruktur des Komplexes aus beiden Proteinen bestätigte erneut die bereits in den *Pulldown*-Experimenten beobachtete Interaktion. Eine weitere Charakterisierung der Interaktion zwischen HP1451 und Cag α identifizierte HP1451 als negativen Regulator der VirB11-homologen ATPase (Hare *et al.*, 2007). Dabei zeigten biochemische Studien eine Inhibierung der ATPase-Aktivität von Cag α auf 30% gegenüber dem Wildtyplevel. Es wurde vermutet, dass HP1451 damit als Inhibitor der Cag-vermittelten Sekretion durch Blockierung der ATPase-Aktivität von Cag α fungieren und auch Protein-Protein-Interaktionen mit anderen Typ IV-Sekretionssystemkomponenten verhindern könnte. Obwohl hier klare Wechselwirkungen und modulierende Eigenschaften durch HP1451 mit Cag α identifiziert wurden, zeigte eine Deletion des Gens *hp1451* keinerlei Auswirkungen auf die Produktion von Cag α oder die Funktionalität des Cag-Typ IV-Sekretionssystems (Hare *et al.*, 2007). Bisher konnte HP1451 keine Funktion zugeschrieben werden und eine Analyse zur Sequenzhomologie legte eine Rolle im RNA-Metabolismus nahe, nicht in der Typ IV-Sekretion. Es wird angenommen, dass das Substrat CagA durch eine Kammer, gebildet von zwei Untereinheiten von Cag α , transportiert wird (Yeo *et al.*, 2000). Unter bestimmten Bedingungen könnte HP1451 durch

Interaktion mit Cag α den CagA-Transport blockieren und so möglicherweise eine unterschiedliche Substratspezifität des Sekretionssystems bedingen. Das Gen *hp513* interagiert in besagtem Interaktionsscreen ebenfalls mit der VirB11-homologen ATPase Cag α . Da die ATPasen in Typ IV-Sekretionssystemen notwendig für den Aufbau des Apparats und die Zuführung des Substrats in den Apparat notwendig sind, könnte auch dieses Gen einen modulierenden Faktor von Cag α darstellen. Allerdings wurde noch keine Interaktion dieser beiden Proteine *in vitro* oder *in vivo* gezeigt. Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit deuten ebenfalls auf keine essentielle Interaktion für die Funktionalität von Cag α hin. Weitere, vor allem biochemische Studien sind notwendig, um eine mögliche Funktion von HP513 in der Typ IV-Sekretion zu zeigen.

Auch bei der Interaktion zwischen HP496 und CagA zeigten sich keinerlei Auswirkungen auf die Translokation von CagA in einer *hp496*-Deletionsmutante. Das Protein HP496 wurde kürzlich als Acyl-CoA-Thioesterase (HpYbgC) mit Präferenz für langkettige Acyl-CoA-Derivate identifiziert (Angelini *et al.*, 2008). Dies legt ebenfalls keine Involvierung in der Typ IV-Sekretion nahe. Da aber CagA sowohl mit der bakteriellen Membran, als auch nach Translokation in der Wirtszelle mit der eukaryontischen Membran assoziiert ist (Pattis *et al.*, 2007; Higashi *et al.*, 2002a), kann auch hier eine wirts- oder zelltypspezifische Modifizierung des Effektorproteins durch HpYbgC nicht ausgeschlossen werden. Allerdings sind weitere Untersuchungen dafür notwendig. In den hier durchgeführten Assays konnte kein Unterschied zum Wildtyp in den verwendeten Zelllinien beobachtet werden.

2. Der Aufbau des Cag-Typ IV-Sekretionssystems von *H. pylori*

2.1 Vergleich mit dem VirB-System von *A. tumefaciens*

Das VirB-System von *A. tumefaciens* wird als prototypisches Typ IV-Sekretionssystem betrachtet (Christie *et al.*, 2005). Der VirB-Sekretionsapparat besteht einerseits aus einem Kernkomplex mit den Proteinen VirB6, VirB7, VirB8, VirB9, VirB10 und wahrscheinlich VirB3, die möglicherweise einen Translokationskanal über die bakteriellen Membranen bilden. Weiterhin gibt es zwei Komponenten, VirB2 und VirB5, die zusammen mit VirB7 einen periplasmatischen oder extrazellulären Pilus ausbilden. Zwei mit der inneren Membran assoziierte ATPasen (VirB4 und VirB11) stellen Energie für den Apparatsaufbau und/oder die Translokation der Substrate bereit. Schließlich erleichtert eine Peptidoglykan-Hydrolase (VirB1) den Aufbau des Transportkanals und das Kopplungsprotein VirD4 wird benötigt, um das Transportsignal zu erkennen und fungiert möglicherweise als der Translokator des DNA-Substrats. Man nimmt an, dass der Aufbau des Apparats in verschiedenen Schritten erfolgt, der die Bildung von Unterkomplexen mit einschließt, was durch Stabilisierungsnetzwerke, biochemische Studien und *Yeast-Two-Hybrid*-Interaktionsstudien bestimmt wurde (Christie *et al.*, 2005).

Typ IV-Sekretionssysteme wurden in anderen gramnegativen Bakterien oft durch das Vorhandensein von Sequenzhomologien zu *virB*-Genen identifiziert. In anderen α -Proteobakterien wie *Bartonella* oder *Brucella*, findet man ähnliche Operons zum *virB*-Operon von *A. tumefaciens*, mit derselben Anordnung der Gene. Allerdings sind die Ähnlichkeiten unter manchen dieser Genprodukte, wie z.B. für VirB6, VirB7 und VirB8, sogar in diesen verwandten Systemen begrenzt. Im Cag System von *H. pylori*, der ein Mitglied der entfernter verwandten ϵ -Proteobakterien ist, ist eine einfache Zuordnung der Funktionen nach Sequenzähnlichkeiten sehr viel schwerer.

Der Cag Sekretionsapparat besteht aus wenigstens 12 essentiellen und zwei akzessorischen Komponenten, wie durch eine systematische Mutagenese der *cag* Pathogenitätsinsel bestimmt wurde (Fischer *et al.*, 2001b). Nur fünf Komponenten haben klare Homologien zu bekannten T4SS-Komponenten (CagE/HP544 zu VirB4, CagX/HP528 zu VirB9, CagY/HP527 zu VirB10, Cag α /HP525 zu VirB11 und Cag β /HP524 zu VirD4). Die Ergebnisse dieser und vorangegangener Studien lassen allerdings vermuten, dass zehn dieser Komponenten (CagY, CagC, CagE, CagW, CagT, CagV, CagX, CagY, Cag α , and Cag β) entsprechend analoge Funktionen zu den VirB1, VirB2, VirB3/4, VirB6, VirB7, VirB8, VirB9, VirB10, VirB11, und VirD4-Proteinen von *A. tumefaciens* erfüllen. In *A. tumefaciens* geht man davon aus, dass die strukturellen Proteine VirB3, VirB4, VirB6, VirB7, VirB8, VirB9 und VirB10 einen Multiproteinkomplex bilden, mit VirB4, VirB6, VirB8, VirB10 und möglicherweise auch VirB3 lokalisiert in der Zytoplasmamembran und VirB7 und VirB9 an der äußeren Membran (Christie *et al.*, 2005). VirB10 vermittelt wahrscheinlich in einer energie-verbrauchenden Art und Weise den Kontakt zwischen Komponenten der inneren und äußeren Membran (Cascales and Christie, 2004b). Die hier gezeigten Daten unterstützen eine ähnliche Lokalisierung der entsprechenden Cag Komponenten (**Abb. IV.1, Kapitel IV.2.2**).

Dies ist auch der Fall für CagC, das sowohl mit der Zytoplasmamembran fraktioniert, als auch mit der äußeren Membran assoziiert ist, was konsistent mit seiner möglichen Rolle als VirB2-ähnliches Pilin ist. Die Beobachtung, dass CagC das am häufigsten vorkommende der auf der *cag*-Pathogenitätsinsel kodierten Proteine ist (Boonjakuakul *et al.*, 2005), argumentiert für seine Rolle als Pilin Untereinheit. Von CagC wurde gezeigt, dass es extrazelluläre Strukturen bildet (Andrzejewska *et al.*, 2006), aber ob es eine Komponente der charakteristischen Anhängsel des Cag-Typ IV-Sekretionsapparats ist, muss noch gezeigt werden (Rohde *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2003). Es konnten in dieser Arbeit keinerlei Interaktionen von CagC mit anderen Cag-Komponenten nachgewiesen werden, möglicherweise auch wegen seiner ausgeprägten Hydrophobizität.

Die Computervorhersagen deuten daraufhin, dass CagE eine Fusion aus einer VirB3- und einer VirB4 analogen Proteindomäne darstellt, ähnlich zum CmgB3/B4 Protein von *Campylobacter* (Batchelor *et al.*, 2004). Abgesehen von seinem N-terminalen Teil zeigt CagE signifikante Ähnlichkeit zu VirB4 und es enthält auch konservierte Motive, die für diese Proteinfamilie identifiziert wurden (Rabel *et al.*, 2003). In Analogie zum ComB System, in dem ComB4 mit ComB10 interagiert (Rain *et al.*, 2001; Terradot *et al.*, 2004), würde man eine Interaktion zwischen CagE und CagY erwarten. Diese wurde auch durch *Yeast-Two-Hybrid*-Analyse gefunden (Busler *et al.*, 2006).

Nimmt man an, dass CagW wahrscheinlich ein VirB6-analoges Protein im Cag-System ist, dann scheint die einzige fehlende VirB-Komponente im Cag-Typ IV-Sekretionssystem ein VirB5-ähnliches Protein zu sein. Ein VirB5-ähnliches Protein fehlt auch im Ptl-System von *Bordetella pertussis* (Weiss *et al.*, 1993). VirB5 ist eine Piluskomponente von geringerer Bedeutung im VirB System (Schmidt-Eisenlohr *et al.*, 1999a) mit einer möglichen Adhäsion-ähnlichen Funktion (Yeo *et al.*, 2003). Eine entsprechende Funktion könnte im Cag System von CagL übernommen werden, von dem kürzlich gezeigt wurde, dass es eine Oberflächenkomponente darstellt, die mit Integrinen als Wirtszellrezeptoren interagiert (Kwok *et al.*, 2007).

Obwohl die meisten VirB-ähnlichen Komponenten im Cag System vorhanden zu sein scheinen, so deuten die Ergebnisse einen unterschiedlichen Aufbau des Sekretionsapparats an. Die *Yeast-Two-Hybrid*-Daten zum Beispiel zeigen Interaktionen zwischen den periplasmatischen Bereichen des VirB8-ähnlichen Proteins CagV und dem VirB10-ähnlichen Protein CagY mit der periplasmatischen Komponente CagN. Allerdings ist CagN nicht essentiell für einen funktionellen Sekretionsapparat, was darauf hinweist, dass diese Interaktionen nicht absolut benötigt werden. Kürzlich wurde berichtet, dass CagN nahe seines C-Terminus prozessiert wird (Bourzac *et al.*, 2006), aber die funktionelle Bedeutung dieser Prozessierung ist momentan noch unklar. Obwohl die entsprechenden Kombinationen in diesem *Yeast-Two-Hybrid*-Assay negativ waren, ist es dennoch möglich, dass CagV und CagY direkt miteinander interagieren, analog zu der Interaktion zwischen VirB8 und VirB10 (Das and Xie, 2000). Interessanterweise interagierte die mittlere Region von CagY mit seiner C-terminalen Region, was auf eine Oligomerisierung von CagY hindeutet. Zur Zeit ist aber noch unklar, ob solch eine Interaktion im Periplasma stattfindet (wie in **Fig IV.1** dargestellt), oder auf der Zelloberfläche, wo zumindest der CagY_b-Bereich detektiert wurde (Rohde *et al.*, 2003). Die 500 C-terminalen Aminosäuren von CagY, die mit der CagY_b Region überlappen und die gesamte CagY_c Region umfassen, wurden in einem *Yeast-Two-Hybrid*-Experiment als Interaktionspartner von CagX gefunden (Busler *et al.*, 2006). Die Tatsache, dass in dieser Arbeit keine *Yeast-Two-Hybrid*-Interaktion zwischen CagY_c und CagX gefunden wurde, könnte andeuten, dass auch ein Teil von CagY_b für diese Interaktion benötigt wird.

Die essentiellen Komponenten Cag δ , CagU, CagM, CagL und CagH und die akzessorischen Komponenten CagN und CagD sind spezifisch für den Cag-Sekretionsapparat. CagU und CagH wurden als integrale zytoplasmatische Membranproteine vorhergesagt (**Abb. IV.1 und Abb.III.2.1**). In dieser Arbeit wurden schwache Interaktionen dieser Proteine im *Yeast-Two-Hybrid*-Screen entdeckt, aber ob sie Teil eines Kernkomplexes des Cag-Sekretionsapparats sind oder andere Funktionen haben, ist derzeit unklar. Generell wurden wenige Interaktionen zwischen zytoplasmatischen, membran-assoziierten Komponenten des Sekretionsapparats gefunden, möglicherweise aufgrund des Vorhandenseins von Transmembranhelizes in einigen benutzten Konstrukten. In einer kürzlich veröffentlichten *Yeast-Two-Hybrid*-Studie (Busler *et al.*, 2006) wurden auch Interaktionen mit CagE-, CagV- und Cag β -Konstrukten, die immer noch ihre Transmembranbereiche enthielten, identifiziert. Dieser Unterschied könnte eine höhere Stringenz in dem hier durchgeführten Ansatz reflektieren, die nur zur Identifizierung stärkerer Interaktionen führt, oder vielleicht einfach auf den verschiedenen benutzten *bait*- und *prey*-Vektoren basiert. In diesem Versuchsansatz konnten keinerlei Interaktionen entdeckt werden, bei denen die periplasmatischen Proteine Cag δ und CagD involviert sind, während bei Busler *et al.*, 2006 etliche Interaktionen von Cag δ identifiziert wurden, z.B. mit CagV und CagM.

2.2 Identifizierung eines Cag-Protein-Subkomplexes und Erstellen eines Apparatsmodells

Ein wichtiges Ergebnis dieser Arbeit ist die Identifizierung eines Cag-Protein-Subkomplexes, der an der äußeren Membran lokalisiert ist. Es konnten stabilisierende Funktionen zwischen CagM, CagX, CagY und dem Lipoprotein CagT gezeigt werden. Während CagX ähnlich dem Marker für die äußere Membran, AlpB, fraktionierte, so konnten nur geringe Anteile von CagM und CagT in den Fraktionen der äußeren Membran gefunden werden. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass CagM wahrscheinlich indirekt mit der äußeren Membran über CagX und/oder CagT interagiert und dass Lipoproteine wie CagT oft ein untypisches Verhalten bei Detergenzextraktionen zeigen. Die *Yeast-Two-Hybrid*-Daten zeigten Interaktionen von CagM mit sich selbst und mit der mutmaßlichen äußeren Membrankomponente CagX. Die Immunpräzipitationsexperimente lieferten eine detaillierte Charakterisierung der wechselseitigen Interaktionen zwischen CagY, CagX, CagM und CagT. Dabei zeigten sich direkte Interaktion zwischen CagT und CagM, CagX und CagM, sowie CagX und CagY. Zusammengenommen lassen die Stabilitätseffekte, die Lokalisierung und die Protein-Protein Interaktionen auf einen Komplex aus CagX, CagT und CagM auf der periplasmatischen Seite der äußeren Membran schließen, der über CagX mit CagY als mögliche Brückekomponente zwischen der Zytoplasma- und der äußeren Membran interagiert (**Abb.IV.1**). Da für alle diese Proteine (außer CagY) *coiled-coil*-Domänen vorausgesagt wurden, ist man versucht zu spekulieren, dass die Interaktionen über diese Bereiche stattfinden. Alternativ könnten diese *coiled-coils* auch für Interaktionen mit dem Effektorprotein CagA benützt werden, wie dies für Typ III-Sekretionssysteme vermutet wird (Delahay and Frankel, 2002).

Da Teile des CagX-Proteins auf der bakteriellen Oberfläche exponiert sind (Tanaka *et al.*, 2003), erscheint es angemessen anzunehmen dass CagX eine Sekretin-ähnliche Pore in der äußeren Membran bildet, was auch für VirB9 angenommen wird (Bayliss *et al.*, 2007; Jakubowski *et al.*, 2005). Diese Pore könnte den Durchtritt von oberflächlichen, pilus-ähnlichen Anhängseln und/oder translozierten Substraten über die äußere Membran erlauben. In Typ II- und Typ III-Sekretionssystemen bilden Sekretine typischerweise homomultimere Komplexe, die resistent gegenüber SDS sind (Thanassi, 2002). Die Assemblierung dieser Komplexe in der äußeren Membran benötigt das Vorhandensein entsprechender Lipoproteine, die als Pilotine benannt wurden (Guilvout *et al.*, 2006). Anscheinend nehmen die Porenkomplexe der äußeren Membran bei Typ IV-Sekretionssystemen andere Strukturen als die Sekretine an (Bayliss *et al.*, 2007). Kürzlich konnte durch elektronenmikroskopische Untersuchungen ein Kernkomplex des Typ IV-Sekretionssystems des Plasmids pKM101 identifiziert und näher untersucht werden (Fronzes *et al.*, 2009). Dieser durchspannt beide Membranen durch Interaktionen der Proteine TraN (VirB7) und TraO (VirB9) an der äußeren Membran mit TraF (VirB10) in der inneren Membran. Diese Daten zeigen somit einen ähnlichen Komplex wie er in dieser Arbeit beim Cag-System identifiziert wurde, allerdings scheint der Aufbau hier komplexer. Im Cag-System benötigt die Interaktion zwischen CagX (VirB9) und CagT (VirB7) die Anwesenheit von CagM, das keine Sequenzähnlichkeit zu Komponenten anderer Typ IV-Sekretionssysteme besitzt. Nachdem die *Yeast-Two-Hybrid*-Daten eine starke Interaktion von CagM mit sich selbst enthielten, lässt sich spekulieren, dass CagM die Oligomerisierung des CagX-CagM-CagT-Komplexes an der äußeren Membran bestimmt. Das pKM101-System zeigt eine Stöchiometrie von 1:1:1 der verschiedenen

Komponenten, wobei jeweils 14 Kopien der einzelnen Proteine den Kernkomplex bilden (Fronzes *et al.*, 2009). Beim Komplex aus CagM-CagX-CagT hingegen könnte eine andere Stöchiometrie vorliegen, nachdem CagM nicht nur mit den anderen Komponenten interagiert, sondern auch mit sich selbst.

Passend zu der Annahme, dass CagT ein VirB7-ähnliches Protein ist (Akopyants *et al.*, 1998), konnte hier gezeigt werden, dass CagT mit der äußeren Membran assoziiert ist und es wurde bereits früher gezeigt, dass es zumindest teilweise auf der bakteriellen Zelloberfläche exponiert ist (Rohde *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2003). Allerdings sind VirB7 und VirB7-ähnliche Proteine kleine Lipoproteine, bestehend aus 45-70 Aminosäuren, und stabilisieren und interagieren direkt mit ihren entsprechenden VirB9-ähnlichen Faktoren. CagT hingegen ist ein viel größeres Protein und stabilisiert CagX nicht. Die Daten dieser Arbeit lassen vermuten, dass die Interaktion zwischen CagX und CagT indirekt über CagM vermittelt ist. Allerdings sollte erwähnt werden, dass konservierte Motive, die zu der Interaktionsoberfläche zwischen VirB9- und VirB7-ähnlichen Proteinen beitragen (Bayliss *et al.*, 2007), auch in der CagX Sequenz vorhanden sind (Daten nicht gezeigt). Mit seiner Größe von 280 Aminosäuren scheint CagT ein Mitglied einer zweiten Klasse von Lipoproteinen zu sein, die an Typ IV-Sekretionssystemen beteiligt sind. Beispielsweise benötigt die Konjugation des Plasmids RP4 das 160 Aminosäuren große Lipoprotein der äußeren Membran TrbH (Grahn *et al.*, 2000), und F-ähnliche Konjugationssysteme enthalten auch essentielle Lipoproteine der äußeren Membran wie TraV, mit einer Größe von 171 Aminosäuren (Harris *et al.*, 2001; Lawley *et al.*, 2003). Interessanterweise enthält das MagB-Typ IV-Sekretionssystem von *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Proteine mit Ähnlichkeit sowohl zu VirB7 als auch CagT (Galli *et al.*, 2001). Die Typ IV-Sekretionssysteme ComB und Tfs3 von *H. pylori* hingegen enthalten VirB7-ähnliche, aber keine CagT-ähnlichen Proteine (Hofreuter *et al.*, 2001; Kersulyte *et al.*, 2003).

Zusammenfassend liefert diese Arbeit ein erstes strukturelles Modell einschließlich des kompletten Sets der Proteine des Cag-Sekretionsapparats (siehe **Abb.IV.1**). Dieses Modell kann als Grundlage für die Bestimmung der Funktionen Cag-spezifischer oder konservierter Typ IV-Sekretionskomponenten mit Cag-spezifischen Domänen benutzt werden. Vor kurzem konnte in ähnlicher Weise ein transmembraner Subkomplex im zur Klasse der Typ IVB-Systeme gehörende Dot/Icm-Sekretionssystem von *L. pneumophila* identifiziert werden. Durch Lokalisierungs-, Stabilisierungs- und Interaktionsstudien wurde so ebenfalls ein erstes Modell dieses Systems erstellt (Vincent *et al.*, 2006). Es zeigte sich hier, dass der Kernkomplex des *Legionella*-Systems funktionell analog zum VirB-System ist, was eine bemerkenswerte Konservierung im Grundaufbau in den evolutionär entfernten Typ IV-Sekretionsmaschinen vermuten lässt. Allerdings sind weitere Studien für das Verständnis spezialisierter und gut angepasster Funktionen in verschiedenen Typ IV-Sekretionssystemen im Detail notwendig. In untenstehender **Abb. IV.1** ist das schematische Arbeitsmodell zur Zusammensetzung des Cag-Sekretionsapparats nach den Erkenntnissen dieser und vorangegangener Arbeiten dargestellt.

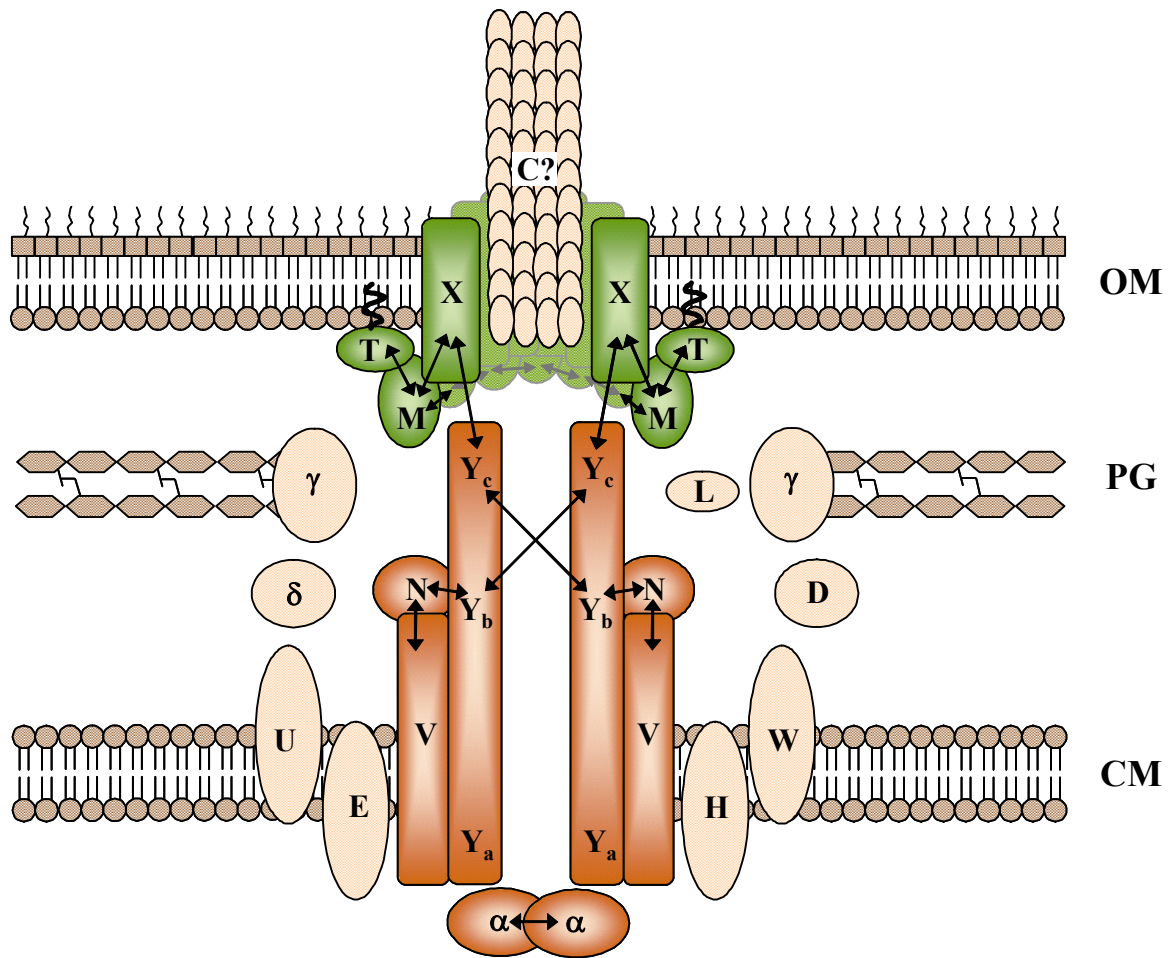


Abb.IV.1: Schematisches Modell der Zusammensetzung des Cag-Typ IV-Sekretionsapparats. Alle Komponenten des Sekretionsapparats sind in ihrer möglichen Lokalisierung nach den Computervorhersagen, den Fraktionierungen und den Interaktionsdaten dargestellt. Die Proteinennamen wurden abgekürzt, sodass beispielsweise X das CagX-Protein darstellt. Die mutmaßliche Lokalisierung von (Teilen von) CagY (Rohde *et al.*, 2003) und CagL (Kwok *et al.*, 2007), auf extrazellulären Anhängseln des Cag-Systems, ist nicht miteinbezogen. Protein-Protein-Interaktionen, die in dieser Arbeit identifiziert oder bestätigt wurden, werden mit Doppelpfeilen angezeigt. Die direkten Interaktionen zwischen Komponenten der äußeren Membran (CagY-CagX, CagX-CagM, und CagM-CagT) wurden durch Co-Immunpräzipitation bestätigt, alle anderen Interaktionen wurden nur durch die *Yeast-Two-Hybrid*-Daten gezeigt. Der mögliche Aufbau eines Sekretin-ähnlichen heterooligomeren Komplexes an der äußeren Membran ist durch die grünen Kästchen angedeutet. Ein Subkomplex an der Zytoplasmamembran erscheint in dunklen orangen Kästchen. Komponenten, für die keine Interaktionen identifiziert wurden, sind in hellem Orange sichtbar. Weitere Details finden sich im Text. CM, Zytoplasmamembran; PG, Peptidoglykan; OM, äußere Membran.

3. Translokation des CagA-Proteins

3.1 Wechselwirkungen des Sekretionsapparats mit Integrinen als Rezeptoren auf der Wirtszelloberfläche

Integrine sind Rezeptormoleküle auf der eukaryontischen Zelloberfläche, die Interaktionen zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix vermitteln. In adhärenen Zellen konzentrieren sie sich in fokalen Adhäsionen und verankern die Zellen dadurch nicht nur an die extrazelluläre Matrix, sondern verbinden auch die Zellaußenseite mit der Organisation des Aktin-Zytoskeletts. Integrin-Komplexe vermitteln Signale sowohl ins Zellinnere (*outside-in signalling*), als auch ins Zelläußere (*inside-out signalling*) (Brunton *et al.*, 2004; Hynes, 2002). Die Konserviertheit, ihre Signalkapazität und ihre Oberflächenexposition machen sie zu häufig benutzten Zielen für Pathogene, um an Wirtszellen zu adhären und deren Funktion für ihre eigenen Zwecke zu nutzen. Zahlreiche Beispiele lassen sich sowohl bei grampositiven als auch bei gramnegativen Krankheitserregern finden (Hauck, 2002; Boyle and Finlay, 2003; Scibelli *et al.*, 2007). Die Interaktionen finden dabei entweder direkt über ein Adhäsion mit dem Integrin statt, wie im Falle des Invasins von *Yersinia* (Isberg *et al.*, 1987 and 2000; Tran Van Nhieu and Isberg, 1993). Oder die Interaktion findet indirekt durch Bindung eines natürlichen Liganden des Integrins statt. YadA, ein weiteres *Yersinia*-Adhäsion, interagiert so indirekt mit β_1 -Integrinen über die Bindung von Proteinen der extrazellulären Matrix wie Fibronectin oder Collagen (El Tahir and Skurnik, 2001) und stellt so einen zweiten Aufnahmeweg in Zielzellen dar, nach der Invasin-vermittelten Translokation über die intestinale Barriere (Eitel and Dersch, 2002).

In der Pathogenese von *H. pylori* spielen Integrine eine wichtige Rolle als Rezeptoren von Virulenzfaktoren. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme des vakuolisierenden Zytotoxins VacA in humanen T-Zellen durch β_2 -Integrine vermittelt wird (Sewald *et al.*, 2008). Auch wurde das $\alpha_5\beta_1$ -Heterodimer als Rezeptor für den Cag-Typ-IV-Sekretionsapparat ermittelt (Kwok *et al.*, 2007). Die strukturelle Beschaffenheit des Sekretionspilus und der Mechanismus der Translokation sind jedoch nicht gut verstanden, obwohl die pilus-ähnlichen Strukturen auf der Oberfläche von *H. pylori*-Zellen bereits elektronenmikroskopisch untersucht und charakterisiert werden konnten. Eine Analyse dieser Strukturen ergab eine Beteiligung der *cag*-PAI-Proteine CagY, als Bestandteil auf der Oberfläche des Pilus, sowie CagX und CagT an der Basis dieser Organelle. Bei der Identifizierung des β_1 -Integrins als Rezeptor des Sekretionsapparats zeigte sich die Beteiligung eines weiteren Proteins der *cag*-Pathogenitätsinsel, dem CagL-Protein, dem die Interaktion mit dem Integrin über ein RGD-Motiv und somit eine mögliche Rolle als Adhäsion zugeschrieben wird (Kwok *et al.*, 2007). Zudem wird auch das CagC-Protein als mögliches Pilin und VirB2-Homolog diskutiert (Andrzejewska *et al.*, 2006) und so bleibt die genaue strukturelle Beschaffenheit des Pilus und die Funktionen der einzelnen Komponenten noch unklar.

Nachdem die Rolle des Pilus, die Art der Interaktion mit dem Integrin und der Mechanismus der CagA-Translokation weitgehend unverstanden sind, sollten im Rahmen dieser Arbeit weitere mögliche Interaktionspartner der *cag*-Pathogenitätsinsel mit dem β_1 -Integrin untersucht werden. Dafür wurde das *Yeast-Two-Hybrid*-System angewendet und die extrazelluläre Domäne des humanen β_1 -Integrins gegen alle Proteine der *cag*-Pathogenitätsinsel und deren Proteinvarianten getestet. Dabei konnten drei positive Interaktionen festgestellt werden.

Zum Einen interagiert der C-terminale Teil des CagY-Proteins (CagY_C) mit dem Integrin, zum Anderen ein Translokationsfaktor, CagI. Schließlich interagiert auch das CagA-Protein selbst, und zwar die N-terminale Hälfte CagA_a, spezifisch mit dem Integrin. Die Oberflächenassoziiierung von CagA konnte bereits durch elektronenmikroskopische Aufnahmen dargestellt werden (Kwok *et al.*, 2007; Jimenez *et al.*, eingereicht) und auch die Daten aus den Untersuchungen zur Cystein-Zugänglichkeit in dieser Arbeit deuten auf eine Oberflächenexposition des Effektorproteins auf der *H. pylori*-Zelle hin. Diese *Yeast-Two-Hybrid*-Ergebnisse konnten auch in *Pulldown*-Experimenten nativer *H. pylori*-Proteine mit funktionellen β_1 -Heterodimeren, gekoppelt an magnetische Kügelchen, bestätigt werden. Dabei zeigte sich, dass CagA mit dem β_1 -Integrin ohne eine andere Komponente der *cag*-PAI interagieren kann. Weiterhin kann die Interaktion mit einem spezifischen Antikörper gegen den N-terminalen Bereich von CagA (AK268) blockiert werden, was ebenfalls auf eine Oberflächenexposition von CagA hindeutet und die Interaktion bestätigt (Jimenez *et al.*, eingereicht). CagY wurde bereits als Komponente des pilus-ähnlichen Filaments beschrieben (Rohde *et al.*, 2003) und *Pulldown*-Experimente mit nativem und rekombinantem Protein bestätigten eine direkte Interaktion mit dem Integrin, unabhängig von anderen Proteinen der *cag*-PAI (Jimenez *et al.*, eingereicht). CagI hingegen ist ein noch weitgehend unbekanntes Protein, das als Translokationsfaktor für CagA beschrieben wurde (Fischer *et al.*, 2001b). Es ist essentiell für die Translokation von CagA, aber nicht zwingend Bestandteil des Apparats. Sequenzanalysen zeigen für CagI einen Sec-abhängigen Transport ins Periplasma, aufgrund einer vorhandenen Signalsequenz (Tomb *et al.*, 1997). FACS-Untersuchungen mit einem GST-Fusionsprotein von CagI zeigten eine signifikant höhere Bindung an β_1 -produzierende Zellen als an Integrin-defiziente, was CagI als dritte Komponente des Cag-Typ IV-Sekretionssystems, die mit β_1 -Integrin interagiert, bestätigt (Jimenez *et al.*, eingereicht). Auch die Tatsache, dass β_1 -Integrin mit verschiedenen Kombinationen von α -Ketten (α_1 bzw. α_5) die Cag-Proteine präzipitierte, zeigte die Bindung dieser Proteine an die β_1 -Untereinheit, weniger an die α -Untereinheit, und bestätigte die Ergebnisse des *Yeast-Two-Hybrid*-Assays. Die kürzlich beschriebene Interaktion zwischen CagL und β_1 -Integrinen (Kwok *et al.*, 2007) wurde in dem hier durchgeführten *Yeast-Two-Hybrid*-Screen zwischen der extrazellulären Domäne des humanen β_1 -Integrin und den Komponenten der *cag*-Pathogenitätsinsel nicht gefunden. Dies könnte aber daran liegen, dass sich die RGD-bindende Domäne aus der Grenzfläche zwischen der β -Propeller-Domäne der α -Untereinheit und der I-ähnlichen Domäne der β -Untereinheit des Integrins zusammensetzt. Dabei interagieren Aminosäurereste von beiden Domänen direkt mit dem RGD-Peptid des Liganden (Xiong *et al.*, 2002). Da hier nur die β -Untereinheit in dem *Yeast-Two-Hybrid*-Screen verwendet wurde, war die Interaktion mit CagL aufgrund der fehlenden α -Untereinheit nicht möglich. Allerdings konnte zudem die Notwendigkeit des RGD-Motivs von CagL im Stamm P12 bei der Translokation in AGS-Zellen nicht bestätigt werden (W. Fischer, persönl. Mitteilung).

3.2 Interaktionen von CagA mit seinen Translokationsfaktoren und Apparatskomponenten

Vier auf der *cag*-Pathogenitätsinsel kodierte Proteine, die sogenannten Translokationsfaktoren CagF, CagI, CagZ und Cag β , sind neben den Apparatsproteinen für die CagA-Translokation notwendig (Fischer *et al.*, 2001b). Um eine genauere Vorstellung und Anhaltspunkte für den Translokationsmechanismus des CagA-Proteins zu bekommen, wurde ein umfassender *Yeast-Two-Hybrid*-Screen auf Proteininteraktionen mit den Komponenten der *cag*-PAI durchgeführt. Zahlreiche Interaktionen zwischen CagA, seinen Translokationsfaktoren und Apparatskomponenten wurden dabei entdeckt (**siehe Tabelle II.2.12 und Abb.IV.2**). So interagiert CagA mit allen vier Translokationsfaktoren, mit den Apparatskomponenten CagU, CagG und CagY, sowie mit sich selbst. CagF interagiert mit den VirB9- bzw. VirB10-homologen Apparatskomponenten CagX und CagY. Cag β zeigte Interaktionen mit CagZ, sowie den Apparatsproteinen CagT und CagL und CagY.

Die Interaktion zwischen CagA und CagF wurde auch in einem anderen *Yeast-Two-Hybrid*-Screen identifiziert. In diesem Ansatz fanden sich noch weitere Interaktionen zwischen CagF mit CagZ, CagY, CagG, CagT und CagM (Busler *et al.*, 2006). Auch konnte die CagA-CagF Wechselwirkung in Immunpräzipitationsexperimenten bestätigt werden (Couturier *et al.*, 2006; Pattis *et al.*, 2007). Weitergehende Untersuchungen zur Rolle von CagF sprechen diesem Protein eine Funktion als Sekretionschaperon zu. Es ist im Zytoplasma und an der zytoplasmatischen Membran lokalisiert. Die Interaktion mit CagA ist unabhängig von anderen Translokationsfaktoren oder dem Sekretionsapparat, was die *Yeast-Two-Hybrid*-Daten bereits andeuten, und findet an der Zytoplasmamembran statt. Auch ist es nicht für die Membranrekrutierung von CagA notwendig und umgekehrt (Pattis *et al.*, 2007). CagA und CagF gelangen also unabhängig voneinander an die Zytoplasmamembran, an welcher dann die Interaktion stattfindet, d.h. keiner der Partner hat eine Rekrutierungsfunktion für den anderen. In umfangreichen *Pulldown*-Experimenten wurde die Interaktionsdomäne von CagF auf dem CagA-Protein auf die Aminosäurereste 1019-1123 eingegrenzt und liegt somit direkt stromaufwärts des C-terminalen CagA-Translokationssignals (Hohlfeld *et al.*, 2006). Weiterhin ist die CagF-Binderegion essentiell für einen dominant-negativen Effekt von GFP-CagA-Fusionsproteinen auf *wt*-CagA. Tatsächlich scheint es, als enthalte die CagF-Bindedomäne und die C-terminale Signalregion genügend Informationen, um CagA an den Sekretionsapparat zu rekrutieren. Co-Expressions- und Gelfiltrationsexperimente haben zudem gezeigt, dass CagF als Dimer und mit CagA in einem heterotrimeren Komplex vorliegt (Pattis *et al.*, 2007). Diese Zusammensetzung von Effektor-Sekretionschaperon-Komplexen ist in Typ III-Sekretionssystemen weit verbreitet. So interagieren SycO mit seinem Effektor YopO, SycE mit YopE und SycT mit YopT ebenfalls im Verhältnis 2:1 (Birtalan *et al.*, 2002; Buttner *et al.*, 2005; Letzelter *et al.*, 2006). Diese Ergebnisse legen nahe, dass CagF eine Rekrutierungs- und Vermittlungsfunktion zwischen CagA und dem Cag-Typ IV-Sekretionssystem einnimmt.

Diese Vermutungen werden auch durch weitere Interaktionen von CagF mit Komponenten des Sekretionsapparats unterstützt, wie die *Yeast-Two-Hybrid*-Daten dieser Arbeit zeigen. So zeigte sich eine starke Interaktion von CagF mit dem zytoplasmatischen Teil von CagY (CagY_a) und CagX. Die Interaktion mit CagY wurde auch in bereits oben genanntem Screen identifiziert (Busler *et al.*, 2006). In besagter Studie zeigten sich zudem noch weitere Interaktionen von CagF mit essentiellen Apparatskomponenten, nämlich CagT, CagM und

CagG, sowie mit dem Translokationsfaktor CagZ. Zusammengenommen zeigen sich hier viele Interaktionen mit den Komponenten des in dieser Arbeit identifizierten und charakterisierten Membrankomplexes in der äußeren Membran. Da CagF aber nicht transloziert wird (Pattis *et al.*, 2007), stellt sich die Frage, wie diese Interaktionen zu interpretieren sind. Diese Interaktionen würden eine periplasmatische Lokalisierung von CagF implizieren, so als würde CagF CagA bis zur äußeren Membran „begleiten“, während CagA dann transloziert wird. Allerdings konnte eine Bestätigung dieser Interaktionen noch nicht erbracht werden. Gerade für die Interaktionen mit CagX, CagM und CagT wäre dies sehr wichtig, um die Periplasmalokalisierung von CagF zu bestätigen, zumal es sich um Interaktionen handelt, die in beiden Studien als sehr schwach eingestuft wurden und nur eine Bestätigung mittels anderer Methoden weitere Schlussfolgerungen zulässt. Zwar konnten in der *Yeast-Two-Hybrid*-Studie von Busler *et al.*, 2006, einige Interaktionen durch die Expression und Präzipitation von Proteinfusionen in *E. coli* bestätigt werden, allerdings handelte es sich um Interaktionen, beispielsweise von CagZ mit CagX oder CagM und CagI, deren Komponenten nach den hier durchgeführten Sequenz- und Lokalisierungsstudien räumlich voneinander getrennt sind. Ob es sich dabei um die Beobachtung von Interaktionen handelt, die z.B. beim Aufbau des Apparates stattfinden und später nach fertiger Assemblierung nicht mehr und ob dies tatsächlich *in vivo* Interaktionen in der *H. pylori*-Zelle entspricht, bleibt zu zeigen. Eine Bestätigung durch Immunpräzipitationsexperimente konnte in dieser Arbeit nicht erbracht werden, auch nicht für die starke Interaktion von CagF mit CagY. Dies könnte aber auch daran liegen, dass es sich vielleicht um eine temporäre Interaktion während des Translokationsprozesses handelt und diese nicht mit den gängigen Präzipitationsbedingungen erfasst werden konnte. Alles in Allem offenbart sich hier eine Verbindung von CagF zum Sekretionsapparat über die zytoplasmatische Domäne von CagY. Die an anderer Stelle identifizierte zusätzliche Interaktion mit CagZ (Busler *et al.*, 2006) an der Zytoplasmamembran könnte eine Verbindung zum Kopplungsprotein Cag β darstellen, wie im Folgenden erläutert werden soll.

In *H. pylori* ist das zu VirD4 homologe Protein Cag β (HP524) für die CagA-Translokation notwendig, nicht jedoch für die CagA-unabhängige IL-8-Induktion und damit den Aufbau des Sekretionsapparates (Fischer *et al.*, 2001b). Cag β ist in der zytoplasmatischen Membran lokalisiert, und weist im N-terminalen Bereich drei Transmembrandomänen auf, wobei der N-Terminus laut Vorhersagen ins Periplasma ragt. Der stromabwärts der Transmembrandomänen lokalisierte Teil des Moleküls liegt im Zytoplasma. Cag β assoziiert mit sich selbst (Busler *et al.*, 2006), bildet wahrscheinlich eine Pore in der inneren Membran und wird spezifisch von sekretierten Substraten erkannt (Schröder and Lanka, 2005). Cag β könnte somit als Transporter für die Sekretion ins Periplasma fungieren. Zusätzlich weisen EF-Hand-Motive auf eine Ca²⁺-Bindedomäne hin, was dem Molekül eine Funktion als Calciumsensor zusprechen könnte. In T3SS bei *Yersinia* ist bekannt, dass niedrige Calcium-Werte die Translokation induzieren (DeBord *et al.*, 2003).

Aufgrund seiner drei Membrandomänen wurde das Cag β -Protein in zwei Proteinvarianten für den *Yeast-Two-Hybrid*-Screen kloniert. Einmal wurde die periplasmatische Schleife zwischen Transmembrandomäne 2 und 3 (AS 94-146), zum anderen der zytoplasmatische Bereich nach den Transmembrandomänen ab AS 162-748 separat kloniert. Insgesamt 8 Interaktionen finden sich mit beiden Teilen des Cag β -Moleküls im *Yeast-Two-Hybrid*-Screen, die teilweise

an anderer Stelle ähnlich gefunden wurden (Busler *et al.*, 2006). Mit dem zytoplasmatischen Bereich findet sich eine starke Interaktion mit dem dritten Translokationsfaktor, CagZ, sowie mit CagA. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden weitere Untersuchungen dieser Wechselwirkungen durchgeführt und die gefundenen Interaktionen mittels *Pulldown*-Experimenten bestätigt. Demnach konnte gezeigt werden, dass CagZ eine Stabilisierungsfunktion für Cag β übernimmt, denn in einer *cagZ*-Mutante ist die Produktion von Cag β stark reduziert. Dieser Effekt kann durch Komplementation mit CagZ wiederhergestellt werden und ist nicht auf einen polaren Effekt zurückzuführen (A. Jurik, W. Fischer, unveröffentlicht). Weiterhin interagieren Cag β und CagZ unabhängig von CagA, was die *Yeast-Two-Hybrid*-Daten bestätigt. Auch wurde eine Interaktion zwischen CagZ und CagA gefunden, die Cag β -unabhängig ist. Aus der Kristallstruktur wurde für CagZ eine chaperon-ähnliche Funktion vermutet. Die molekulare Beschaffenheit der Oberfläche von CagZ lässt vermuten, dass es an der Interaktion von Effektorproteinen mit Komponenten des Sekretionsapparats an der Innenseite der Zytoplasmamembran teilnehmen könnte (Cendron *et al.*, 2004). Aus der 3D-Struktur geht hervor, dass es sich dabei eher um transiente Interaktionen handeln könnte und es sich somit um eine zeitweise Assistenz bei den frühen Schritten des Translokationsprozesses handelt. Es könnte die Rolle eines sogenannten Substrat-Selektor-Proteins übernehmen, die in manchen Typ IV-Sekretionssystemen vorkommen und in der Lage sind, Kopplungsproteinen die zu translozierende DNA spezifisch zu vermitteln. Ein Beispiel hierfür ist das Relaxosom-Protein TraM, das mit dem TraD-Kopplungsprotein des F-Plasmid-Systems interagiert. TraM bindet spezifisch an das F-Plasmid und danach an TraD mit bisher ungeklärter Bindungsregion und ermöglicht TraD so, nur das F-Plasmid zu translozieren (Beranek *et al.*, 2004). CagZ könnte also sowohl an CagA binden als auch mit Cag β interagieren und so die Interaktion zwischen Cag β und CagA vermitteln. In einem zweiten *Yeast-Two-Hybrid*-Screen wurde auch eine Interaktion zwischen CagF und CagZ beobachtet (Busler *et al.*, 2006). Allerdings war bei Versuchen, eine Interaktion von CagF mit dem Kopplungsprotein Cag β zu zeigen, stets nur der Komplex CagA-Cag β nachzuweisen und in keinem Fall konnte CagF co-präzipitiert werden (I. Pattis, W. Fischer, unveröffentlicht). Daraus lässt sich schließen, dass CagA entweder mit CagF oder mit Cag β assoziieren kann, aber kein Dreierkomplex möglich ist. Denkbar wäre, dass es sich bei der CagF-Chaperonbindedomäne auf dem CagA-Molekül um denselben Bereich handelt, der für die Interaktion mit dem Kopplungsprotein notwendig ist. Die CagF-Bindung könnte die Zugänglichkeit des C-terminalen Sekretionssignals für die Substraterkennung verbessern oder den C-Terminus teilweise entfalten, nachdem das Effektormolekül durch die gleichzeitige Interaktion von CagF mit CagY in Apparatsnähe positioniert wurde.

In **Abb. IV.2** sind die erhaltenen *Yeast-Two-Hybrid*-Daten zwischen CagA, seinen Translokationsfaktoren und Apparatskomponenten grafisch dargestellt und zusammengefasst.

Interaktionen sowohl mit Periplasmaproteinen auf, aber auch mit CagA und CagZ. Betrachtet man diese Interaktionen genauer, so zeigt sich interessanterweise, dass es sich dabei durchweg um Proteine handelt, die später auch mit dem Rezeptor auf der Wirtszelle, β_1 -Integrin, interagieren, nämlich CagA, CagI, der C-terminalen Region von CagY, CagY_C, sowie CagL. Von daher könnte man vermuten, dass Cag β tatsächlich für den Transport des Effektorproteins CagA ins Periplasma zuständig ist und an dieser Stelle die Assemblierung des Pilus durch Wechselwirkungen der Proteine CagY, CagA, CagI und CagL und die anschließende Translokation durch Interaktion mit β_1 -Integrinen auf der Wirtszelloberfläche stattfindet. Die funktionelle Verbindung zwischen dem periplasmatischen Teil des Kopplungsproteins und den membranüberbrückenden Kanal-Komponenten ist in Typ IV-Sekretionssystemen noch unklar. Direkte Interaktionen wurden zwar postuliert, aber bisher noch nicht biochemisch bewiesen (Cabezón *et al.*, 1997; Hamilton *et al.*, 2000). In *A. tumefaciens* konnten aber tatsächlich schon geringe Mengen translozierter Substrate im periplasmatischen Raum nachgewiesen werden (Chen *et al.*, 2000). Die Proteininteraktionsdaten dieser Arbeit unterstützen diese Theorie weiterhin.

3.3 Periplasmalokalisierung des CagA-Proteins und Translokationsprozess

Um die im vorigen Kapitel aufgestellten Arbeitshypothesen zu überprüfen und untermauern, stellte sich die zentrale Frage, ob eine Periplasmalokalisierung des Effektorproteins CagA nachweisbar ist. Die bisherigen Vermutungen basierten lediglich auf den *Yeast-Two-Hybrid*-Daten, sodass eine Untersuchung mittels anderer Methodik mehr Beweiskraft für diese Hypothese liefern könnte. Bislang konnte keine Methode zur Gewinnung einer reinen Periplasma-Fraktion bei *H. pylori* etabliert werden. Methoden, wie die des osmotischen Schocks, bei dem selektiv die äußere Membran aufgelöst wird, die innere Membran aber intakt bleibt, resultieren bei *H. pylori*-Zellen immer mit einer Kontamination der Proben mit zytoplasmatischen Proteinen, sodass keine aussagekräftigen Ergebnisse erzielt werden können. Deshalb sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob periplasmatisch-lokalisierte Proteine spezifisch markiert und auf diesem Wege nachgewiesen werden können. Dazu wird auf die Zugänglichkeit von natürlichen bzw. künstlich eingeführten Cysteinresten in Proteinen für alkylierende Reagenzien getestet. Proteine an der Oberfläche und im periplasmatischen Raum können so mit Biotin markiert werden, während zytoplasmatische Proteine nicht markiert werden. Zusätzlich kann die Zugänglichkeit der Cysteine oberflächenassoziiierter Proteine vor Markierung blockiert werden, was dann eine klare Unterscheidung zulässt, ob sich diese Proteine oder Bereiche eines Proteins an der Oberfläche, im Zytoplasma oder im Periplasma befinden. Diese Methode wurde bereits erfolgreich bei der Topologieaufklärung der Lactose-Permease LacY (Wang *et al.*, 2002; Bogdanov *et al.*, 2002) und der α -Untereinheit der F₁F₀-ATP-Synthase aus *E. coli* (Long *et al.*, 1998; Wada *et al.*, 1999) angewendet. Auch in Typ IV-Sekretionssystemen wurde diese Methode bereits zur Strukturaufklärung eingesetzt. Sie trug zur Bestimmung der Membrantopologie der Kanaluntereinheit VirB6 in der inneren Membran beim VirB-System von *A. tumefaciens* bei (Jakubowski *et al.*, 2004). Untersuchungen am VirB9/VirB7-Komplex des Typ IV-Sekretionssystems des Plasmids pKM101 mittels dieses Assays führten zur Identifizierung oberflächen- und periplasmalokalisierter Domänen des VirB9-Proteins (Bayliss *et al.*, 2007). Unter Ausnutzung des natürlichen Cysteins im C-Terminus wurde der Assay auf CagA angewendet. Es zeigte sich eine deutliche Markierung des Proteins. Bei vorheriger Anwendung des Blockierungsreagenzes zeigte sich eine verringerte, aber dennoch

vorhandene Markierung. Dies deutet darauf hin, dass CagA außerhalb des Zytoplasmas nachweisbar ist. Dies wurde auch bereits bei elektronenmikroskopischen Aufnahmen, die CagA-Moleküle an der Spitze des Pilus zeigen, vermutet (Kwok *et al.*, 2007; Jimenez *et al.*, eingereicht). Die Reduktion der Markierung bei vorheriger Blockierung, lässt vermuten, dass ein geringer Teil an CagA oberflächen- bzw. pilusassoziiert auftreten könnte. Da trotz Blockierung eine Markierung möglich war, spricht dies für einen Anteil an CagA, der periplasmalokalisiert sein könnte. Verstärkt wird diese Vermutung durch die Kontrollansätze mit dem Oberflächen-Protein BabA, das keine Markierung mehr bei vorheriger Blockierung zeigt und der Ansatz mit Cag α , das mehrere natürliche Cysteine besitzt, aufgrund seiner Zytoplasmalokalisierung aber nicht markiert wird. Dies belegt auch, dass zytoplasmatisches CagA nicht markiert wurde. Um eine Reduktion auf ein Minimum von unspezifisch anhaftendem CagA an lebenden *H. pylori*-Zellen von lysierten Zellen auf Platte zu erreichen, wurden die Markierungsversuche zusätzlich mit Flüssigkulturen durchgeführt. Diese Experimente ergaben aber die gleichen Ergebnisse wie die mit auf Platte gewachsenen Bakterien.

Zusammengenommen lassen die *Yeast-Two-Hybrid*-Interaktionen und die Markierungsexperimente eine Periplasma-Lokalisierung von CagA vermuten, einen endgültigen Beweis stellen sie jedoch nicht dar. Auch konnte ein Einfluß von verschiedenen Apparatskomponenten oder dem Kopplungsprotein auf die periplasmatische Lokalisierung von CagA noch nicht bestimmt werden. Der Assay bedarf hierfür noch weiterer Verbesserungen. Er wurde unter *in vivo* Bedingungen für *H. pylori* etabliert. Die Einführung mehrerer künstlicher Cysteine, die die Faltung und Funktion des CagA-Proteins nicht beeinträchtigen, könnte evtl. stärkere Markierungssignale produzieren und so eine genauere Aussage ermöglichen. Auch die Überexpression solcher CagA-Varianten oder des natürlichen Proteins könnte den Assay verbessern. Ein CagA-Fusionsprotein mit Sec-abhängiger Signalsequenz und damit künstlich herbeigeführtem Export ins Periplasma könnte in Markierungsexperimenten die *in vivo*-Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen und neue Einblicke in den Translokationsmechanismus bei Typ IV-Sekretionssystemen gewähren. Die Aufklärung des Kernkomplexes des pKM101-Sekretionsapparats bestehend aus VirB7-VirB9-VirB10-homologen Proteinen zeigt einen Kanal, der beide Membranen durchspannt und aus zwei Kammern besteht (Fronzes *et al.*, 2009). Der Kanal ist zur zytoplasmatischen Seite hin offen, während er zur extrazellulären Seite durch eine Kappe verschlossen ist. Das VirB10-Homolog TraF bildet die äußere Oberfläche des Kanals, während die VirB9- und VirB7-Homologen TraO und TraN zusammen die Innenseite ausbilden. Diese Daten favorisieren zwar einen Translokationsmechanismus nach dem Kanalmodell, möglicherweise existieren aber auch unterschiedliche Translokationsmechanismen für DNA- und Proteinsubstrate. Während die Daten für das T4SS zum Transport des pKM101-Plasmids auf eine Einschleusung vom Zytoplasma aus in einen Sekretionskanal hindeuten, wird beim Ptl-T4SS von *Bordetella pertussis* das Substrat, das Pertussistoxin, zunächst ins Periplasma transportiert, um dann über den Sekretionsapparat sekretiert zu werden (Burns *et al.*, 2004). Bei der Pilus-vermittelten Sekretion mittels des Typ II-Sekretionssystems in *Vibrio cholerae* wird das Cholera-toxin nach Assemblierung im Periplasma ebenfalls seitlich in den Translokationsapparat eingeschleust (Johnson *et al.*, 2006). Auch ist nicht ausgeschlossen, dass sich der Kernkomplex des pKM101-System seitlich öffnen könnte, um Substrate aus dem Periplasma aufzunehmen. Ein seitliches Öffnen während des Transportprozesses wurde beispielsweise aus der Strukturaufklärung und aus Funktionsanalysen des SecYEG-Systems

geschlossen, bei dem durch ein seitliches Tor die Transmembrandomänen von Membranproteinen bei der Insertion in die Lipidphase abgegeben werden (van den Berg *et al.*, 2004; du Plessis *et al.*, 2009). Die Strukturaufklärung weiterer T4SS wird in Zukunft zeigen, ob aus der Homologie entsprechender Komponenten auch generelle Aussagen über den Translokationsmechanismus abgeleitet werden können, oder ob auch hier die Mechanismen so vielseitig sind wie die transportierten Substrate.

Fasst man die Ergebnisse dieser und vorangegangener Arbeiten zusammen, so könnte man ein mehrstufiges Modell für die Translokation von CagA erstellen. Zunächst erfolgt die Rekrutierung von CagA zum Apparat durch das Sekretionschaperon CagF. Durch Interaktion von CagF mit dem zytoplasmatischen Teil von CagY wird CagA für die Interaktion mit dem Translokationsfaktor CagZ und dem Kopplungsprotein Cag β zur Erkennung des C-terminalen Sekretionssignals positioniert. Danach erfolgt entweder die Einschleusung in den Apparat über die zytoplasmatische Seite des Apparats oder aber CagA wird über das Kopplungsprotein ins Periplasma transportiert und von dort in den Apparat eingebracht. Cag β spielt nun weiterhin eine zentrale Rolle, indem es mit seiner periplasmatischen Schleifenregion die Assemblierung des Apparatspilus koordiniert. Dieser besteht auf der Oberfläche aus Teilen des CagY-Proteins, CagI, CagL und CagA. Durch Interaktion dieser Komponenten mit β_1 -Integrinen als Rezeptoren auf der Oberfläche der Wirtszellzellen kommt es im letzten Schritt zur Translokation von CagA, das an der zytoplasmatischen Seite der Wirtszellmembran von Src-Kinasen phosphoryliert wird. Danach löst phosphoryliertes und unphosphoryliertes CagA durch Interaktion mit einer Vielzahl von eukaryontischen Signalmolekülen verschiedenste zelluläre Effekte aus, die zu den beobachteten Phänotypen führen. In **Abb. IV.3** ist der Translokationsmechanismus von CagA zusammen mit dem derzeitigen Apparatsmodell dargestellt.

V Zusammenfassung

Die Besiedelung mit *Helicobacter pylori* führt zu unterschiedlichen Erkrankungsbildern, die sich im Laufe des Lebens von einer chronischen Entzündung der Magenschleimhaut (Gastritis) hin zu Magengeschwüren und Magenkrebs entwickeln können. Zwar sind etwa 50% der Menschen weltweit mit diesem Bakterium infiziert, allerdings entwickelt nur ein Teil ernstere Krankheitsformen, was u. a. abhängig vom infizierenden Stamm ist. *H. pylori*-Stämme vom Typ I enthalten zwei wichtige Virulenzfaktoren, die aktive Form des vakuolisierenden Zytotoxins VacA und die *cag*-Pathogenitätsinsel. Typ II-Stämmen fehlen diese Virulenzfaktoren. Während VacA zunächst in das extrazelluläre Milieu sekretiert und anschließend von den Wirtszellen aufgenommen wird, transloziert das auf der *cag*-Pathogenitätsinsel kodierte Cag-Typ IV-Sekretionssystem sein Substrat CagA direkt in die Wirtszellen. Dort interagiert CagA mit zahlreichen Zielmolekülen und führt so zu einer veränderten Signaltransduktion und charakteristischen Zytoskelett-Rearrangements, die direkt mit der Pathogenese assoziiert sind.

In dieser Arbeit wurde der Aufbau des Cag-Typ IV-Sekretionssystems genauer untersucht. Zunächst konnten durch Sequenzvergleiche weitere homologe Komponenten zu anderen Typ IV-Sekretionssystemen wie dem VirB-System von *Agrobacterium tumefaciens* identifiziert werden. Folglich enthält das Cag-System homologe Proteine zu praktisch allen VirB-Proteinen, allerdings sind diese teilweise deutlich größer als die entsprechenden Proteine des VirB-Systems. Der Aufbau des Cag-Apparats scheint demnach komplexer zu sein und einzelne Komponenten besitzen möglicherweise noch zusätzliche, Cag-spezifische, Funktionen. Weiterhin sind bereits zahlreiche Interaktionen zwischen *cag*-PAI-Komponenten und chromosomal kodierten Proteinen beschrieben worden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mögliche Effekte der Gene stromaufwärts der Pathogenitätsinsel, *hp0496-hp0519*, auf die Translokation von CagA und die Funktionalität des Sekretionsapparats untersucht. Obwohl einige Interaktionen bereits biochemisch nachgewiesen wurden, ließen sich in den jeweiligen Mutanten keine negativen Auswirkungen auf die Funktionalität des Systems beobachten. Mögliche regulatorische Effekte, die in den untersuchten Assays nicht detektierbar waren, können dennoch nicht ausgeschlossen werden.

Um mögliche Wechselwirkungen zwischen den Komponenten des Sekretionsapparats zu identifizieren, wurden zunächst Stabilisierungseffekte zwischen *cag*-PAI-Komponenten untersucht. Dabei fanden sich verminderte Mengen einiger Proteine bei Abwesenheit anderer Komponenten. Ein umfassender *Yeast-Two-Hybrid*-Screen der Proteine der *cag*-PAI ergab zahlreiche Proteininteraktionen und führte nach Bestimmung der zellulären Lokalisierung der Proteine durch Fraktionierungsexperimente zur Identifizierung eines Subkomplexes des Apparats in der äußeren Membran. Dieser besteht aus den Proteinen CagX, CagT und CagM und steht durch CagY mit der inneren Membran in Verbindung. Im Weiteren konnte der Komplex durch Immunpräzipitationsexperimente näher charakterisiert werden und dabei zeigte sich, dass CagX mit CagY und CagM sowie CagM mit CagT direkt interagieren. So konnte im Folgenden ein erstes Modell des Apparats als Grundlage für weitere funktionelle Studien aufgestellt werden.

Weiterhin wurden zahlreiche Interaktionen zwischen CagA, seinen Translokationsfaktoren und Apparatskomponenten gefunden. Interessanterweise werden einige dieser Interaktionen als periplasmatisch vorausgesagt. Bisher ist unklar, wie das Substrat durch das Typ IV-System transportiert wird und ob die Einschleusung in den Sekretionsapparat von der zytoplasmatischen Seite her erfolgt, oder ob dieser ein anfänglicher Transport ins Periplasma vorangeht. Zum Nachweis einer möglichen Periplasmalokalisierung des CagA-Proteins wurde ein neuer Assay etabliert, bei dem Proteine außerhalb des Zytoplasmas durch Biotinylierung spezifisch markiert werden. CagA konnte hierbei auf der Oberfläche beobachtet werden, allerdings fanden sich auch Hinweise, dass das Substrat während des Translokationsprozesses möglicherweise im Periplasma zu finden ist. Welche *cag*-PAI-Komponenten jedoch dabei beteiligt sind, konnte noch nicht gezeigt werden. Die genaue Definition der Translokationsroute und die Untersuchung beteiligter Faktoren wird Gegenstand zukünftiger Studien sein.

Das β_1 -Integrin wurde kürzlich als ein Rezeptor für den Cag-Typ IV-Sekretionsapparat auf Wirtszellen identifiziert. Bei dieser Interaktion spielt das Protein CagL eine mögliche Rolle als Adhäsion. Der genaue Mechanismus und evtl. weitere daran beteiligte Proteine sind jedoch noch nicht bekannt. Deshalb wurde auch für diese Fragestellung das *Yeast-Two-Hybrid*-System angewendet, um weitere Interaktionspartner der *cag*-PAI mit β_1 -Integrin nachzuweisen. So konnten drei weitere Proteine der *cag*-PAI, nämlich CagY, CagI und CagA gefunden werden, die ebenfalls mit β_1 -Integrin interagieren.

Der Translokationsprozess von CagA könnte nach vorläufigen Erkenntnissen in vier Schritten ablaufen. Zunächst erfolgt eine Rekrutierung zum Apparat über das Sekretionschaperon CagF. Anschließend findet der Transport ins Periplasma unter Beteiligung des Kopplungsproteins Cag β statt. Dann wird CagA in den Apparat eingeschleust, der dann evtl. über CagY und CagX eine Verbrückung zwischen Cytoplasmamembran und äußerer Membran herbeiführt. Schließlich findet im letzten Schritt die Wechselwirkung mit dem Rezeptor β_1 -Integrin und die Translokation in die Wirtszelle statt.

VI Literaturverzeichnis

- Abdallah, M. A., N. C. Gey van Pittius, P. A. DiGiuseppe Champion, J. Cox, J. Luirink, C. M. J. E. Vandenbroucke-Grauls, B. J. Appelmek, and W. Bitter.** 2007. Typ VII secretion-mycobacteria show the way. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**:883-891.
- Aebischer, T., B. Lucas, B., J. Koesling, D. Bumann, and T.F. Meyer.** 2000. How CD4⁺ T cells may eliminate extracellular gastric *Helicobacter*? *J. Biotechnol.* **83**:77-84.
- Akeda, Y. and J. E. Galan.** 2005. Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature* **437**:911-915.
- Akopyants, N. S., S. W. Clifton, D. Kersulyte, J. E. Crabtree, B. E. Youree, C. A. Reece, N. O. Bukanov, E. S. Drazek, B. A. Roe, and D. E. Berg.** 1998. Analyses of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.* **28**:37-53.
- Allen, L.A., Schlesinger, L.S., und Kang, B.** 2000. Virulent strains of *Helicobacter pylori* demonstrate delayed phagocytosis and stimulate homotypic phagosome fusion in macrophages. *J. Exp. Med.* **191**:115-128.
- Amedei, A., A. Cappon, G. Codolo, A. Cabrelle, A. Polenghi, M. Benagiano, E. Tasca, A. Azzurri, M. M. D'Elis, G. Del Prete, and M. de Bernard.** 2006. The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* promotes Th1 immune responses. *J Clin. Invest* **116**:1092-1101.
- Amieva, M.R., R. Vogelmann, A. Covacci, L. S. Tompkins, W. J. Nelson, and S. Falkow.** 2003. Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science* **300**:1430-1434.
- Anderson, L. B., A. V. Hertz, and A. Das.** 1996. *Agrobacterium tumefaciens* VirB7 and VirB9 form a disulfide-linked protein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:8889-8894.
- Angelini, A, L. Cendron, S. Concalves, G. Zanotti, and L. Terradot.** 2008. Structural and enzymatic characterization of HP0496, a YbgC thioesterase from *Helicobacter pylori*. *Proteins* **72**:1212-1221.
- Andrzejewska, J., S. K. Lee, P. Olbermann, N. Lotzing, E. Katzowitsch, B. Linz, M. Achtman, C. I. Kado, S. Suerbaum, and C. Josenhans.** 2006. Characterization of the pilin ortholog of the *Helicobacter pylori* type IV *cag* pathogenicity apparatus, a surface-associated protein expressed during infection. *J. Bacteriol.* **188**:5865-5877.
- Aras, R. A., W. Fischer, G. I. Perez-Perez, M. Crosatti, T. Ando, R. Haas, and M. J. Blaser.** 2003a. Plasticity of repetitive DNA sequences within a bacterial (type IV) secretion system component. *J. Exp. Med.* **198**:1349-1360.
- Aras, R. A., J. Kang, A. I. Tschumi, Y. Harasaki, and M. J. Blaser.** 2003b. Extensive repetitive DNA facilitates prokaryotic genome plasticity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **100**:13579-13584.

Aspholm, M., F. O. Olfat, J. Norden, B. Sonden, C. Lundberg, R. Sjostrom, S. Altraja, S. Odenbreit, R. Haas, T. Wadstrom, L. Engstrand, C. Semino-Mora, H. Liu, A. Dubois, S. Teneberg, A. Arnqvist, and T. Boren. 2006. SabA is the *H. pylori* hemagglutinin and is polymorphic in binding to sialylated glycans. *PLoS. Pathog.* **2**:e110.

Aspholm-Hurtig, M., G. Dailide, M. Lahmann, A. Kalia, D. Ilver, N. Roche, S. Vikstrom, R. Sjostrom, S. Linden, A. Backstrom, C. Lundberg, A. Arnqvist, J. Mahdavi, U. J. Nilsson, B. Velapatino, R. H. Gilman, M. Gerhard, T. Alarcon, M. Lopez-Brea, T. Nakazawa, J. G. Fox, P. Correa, M. G. Dominguez-Bello, G. I. Perez-Perez, M. J. Blaser, S. Normark, I. Carlstedt, S. Oscarson, S. Teneberg, D. E. Berg, and T. Boren. 2004. Functional adaptation of BabA, the *H. pylori* ABO blood group antigen binding adhesin. *Science* **305**:519-522.

Atherton, J. C. 2006. The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastroduodenal diseases. *Annu. Rev. Pathol.* **1**:63-96.

Atherton, J. C., P. M. Sharp, T. L. Cover, G. Gonzalez-Valencia, R. M. Peek, Jr., S. A. Thompson, C. J. Hawkey, and M. J. Blaser. 1999. Vacuolating cytotoxin (vacA) alleles of *Helicobacter pylori* comprise two geographically widespread types, m1 and m2, and have evolved through limited recombination. *Curr. Microbiol* **39**:211-218.

Atmakuri, K., E. Cascales, P.J. and Christie. 2004. Energetic components VirD4, VirB11 and VirB4 mediate early DNA transfer reactions required for bacterial type IV secretion. *Mol. Microbiol.* **54**:1199–1211.

Atmakuri, K., Z. Ding, and P. J. Christie. 2003. VirE2, a type IV secretion substrate, interacts with the VirD4 transfer protein at cell poles of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Microbiol* **49**:1699-1713.

Backert S., and W. Fischer. 2007. Transport von Proteinen und DNA. Typ IV-Sekretion bei Gram-negativen Bakterien. *Naturwissenschaftliche Rundschau.* **60**:10-17.

Backert, S. and T.F. Meyer. 2006. Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Curr. Op. Microbiol.* **9**:207-217.

Backert, S., E. C. Müller, P. R. Jungblut, and T. F. Meyer. 2001. Tyrosine phosphorylation patterns and size modification of the *Helicobacter pylori* CagA protein after translocation into gastric epithelial cells. *Proteomics.* **1**:608-617.

Bamford, K. B., J. Bickley, J. S. Collins, B. T. Johnston, S. Potts, V. Boston, R. J. Owen, and J. M. Sloan. 1993. *Helicobacter pylori*: comparison of DNA fingerprints provides evidence for intrafamilial infection. *Gut* **34**:1348-1350.

Bamford, K. B., X. Fan, S. E. Crowe, J. F. Leary, W. K. Gourley, G. K. Luthra, E. G. Brooks, D. Y. Graham, V. E. Reyes, and P. B. Ernst. 1998. Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T helper cell 1 phenotype. *Gastroenterology* **114**:482-492.

Barnard, F. M., M. F. Loughlin, H. P. Fainberg, M. P. Messenger, D. W. Ussery, P. Williams, and P. J. Jenks. 2004. Global regulation of virulence and the stress response by

CsrA in the highly adapted human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.* **51**:15-32.

Baron, C., Y. R. Thorstenson, and P. C. Zambryski. 1997. Biochemical analysis of the complex between the lipoprotein VirB7 and VirB9 in the membranes of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **179**:1211–1218.

Batchelor, R. A., B. M. Pearson, L. M. Friis, P. Guerry, and J. M. Wells. 2004. Nucleotide sequences and comparison of two large conjugative plasmids from different *Campylobacter* species. *Microbiology* **150**:3507–3517.

Bauer, B., S. Moese, S. Bartfeld, T.F. Meyer and M. Selbach. 2005. Analysis of cell type-specific responses mediated by the type IV secretion system of *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **73**:4643-4652.

Bayliss, R, R. Harris, L. Coutte, A. Monier, R. Fronzes, P.J. Christie, P.C. Driscoll, and G. Waksman. 2007. NMR structure of a complex between the VirB9/VirB7 interaction domains of the pKM101 type IV secretion system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**:1673-1678.

Beranek, A., M. Zettl, K. Lorenzoni, A. Schauer, M. Manhart, and G. Koraimann. 2004. Thirty-eight C-terminal amino acids of the coupling protein TraD of the F-like conjugative resistance plasmid R1 are required and sufficient to confer binding to the substrate selector protein TraM. *J. Bacteriol.* **186**:6999-7006.

Birtalan, S. C., R. M. Phillips, and P. Ghosh. 2002. Three-dimensional secretion signals in chaperone-effector complexes of bacterial pathogens. *Mol. Cell* **9**:971-980.

Björkholm, B., M. Sjölund, P. G. Falk, O. G. Berg, L. Engstrand, and D. I. Andersson. 2001. Mutation frequency and biological cost of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**:14607–14612.

Blaser, M. J. 1999. Where does *Helicobacter pylori* come from and why is it going away? *JAMA* **282**:2260-2262.

Blomstergren, A., A. Lundin, C. Nilsson, L. Engstrand, and J. Lundeberg. 2004. Comparative analysis of the complete cag pathogenicity island sequence in four *Helicobacter pylori* isolates. *Gene* **328**:85-93.

Boncristiano, M., S. R. Paccani, S. Barone, C. Olivieri, L. Patrussi, D. Ilver, A. Amedei, M. M. D'Elis, J. L. Telford, and C. T. Baldari. 2003. The *Helicobacter pylori* vacuolating toxin inhibits T cell activation by two independent mechanisms. *J Exp. Med* **198**:1887-1897.

Boddicker, J.D., and B.D. Jones. 2004. Lon protease activity causes down-regulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 invasion gene expression after infection of epithelial cells. *Infect Immun* **72**:2002–2013.

Bogdanov, M., P.N. Heacock and W. Dowhan. 2002. A polytopic membrane protein displays a reversible topology dependent on membrane lipid composition. *EMBO J.* **21**:2107–2116.

- Boonjakuakul, J. K., D. R. Canfield, and J. V. Solnick.** 2005. Comparison of *Helicobacter pylori* virulence gene expression *in vitro* and in the rhesus macaque. *Infect. Immun.* **73**:4895–4904.
- Boren, T., P. Falk, K. A. Roth, G. Larson, and S. Normark.** 1993. Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science* **262**:1892-1895.
- Bourzac, K. M., L. A. Satkamp, and K. Guillemin.** 2006. The *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island protein CagN is a bacterial membrane-associated protein that is processed at its C terminus. *Infect. Immun.* **74**:2537–2543.
- Boyd, A. P., I. Lambermont, and G. R. Cornelis.** 2000. Competition between the Yops of *Yersinia enterocolitica* for delivery into eukaryotic cells: role of the SycE chaperone binding domain of YopE. *J. Bacteriol.* **182**:4811-4821.
- Boyer, H.W. and D. Roulland-Dussoix.** 1969 A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **41**:459-472.
- Boyle, E.C., and B.B. Finlay.** 2003. Bacterial pathogenesis: exploiting cellular adherence. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**:633-639.
- Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
- Brandt, S., T. Kwok, R. Hartig, W. König, and S. Backert.** 2005. NF- κ B activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**:9300–9305.
- Brandt, S., S. Shafikhani, P. Balachandran, S. Jin, R. Hartig, W. König, J. Engel, and S. Backert.** 2007. Use of a novel coinfection system reveals a role for Rac1, H-Ras, and CrkII phosphorylation in *Helicobacter pylori*-induced host cell actin cytoskeletal rearrangements. *FEMS Immunol Med Microbiol* **50**:190–205.
- Brunton, V. G., I. R. J. Macpherson, and M. C. Frame.** 2004. Cell adhesion receptors, tyrosine kinases and actin modulators: a complex three-way circuitry. *Biochimica et Biophysica Acta* **1692**:121–144.
- Buhrdorf, R., C. Förster, R. Haas, and W. Fischer.** 2003. Topological analysis of a putative *virB8* homologue essential for the *cag* type IV secretion system in *Helicobacter pylori*. *Int. J. Med. Microbiol.* **293**:213-217.
- Burns, D. L.** 2003. Type IV transporters of pathogenic bacteria. *Curr Opin Microbiol* **6**:29-34.
- Burns, D. L., S. Fiddner, A. M. Cheung, and A. Verma.** 2004. Analysis of subassemblies of pertussis toxin subunits *in vivo* and their interaction with the *ptl* transport apparatus. *Infect Immun.* **72**:5365-5372.

- Bury-Moné, S., J. M. Thiberge, M. Contreras, A. Maitournam, A. Labigne, and H. De Reuse.** 2004. Responsiveness to acidity via metal ion regulators mediates virulence in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.* **53**:623-638.
- Busler, V. J., V. J. Torres, M. S. McClain, O. Tirado, D. B. Friedman, and T. L. Cover.** 2006. Protein-protein interactions among *Helicobacter pylori* Cag proteins. *J. Bacteriol.* **188**:4787-4800.
- Butler, S.M., R.A. Festa, M.J. Pearce, and K.H. Darwin.** 2006. Self-compartmentalized bacterial proteases and pathogenesis. *Mol Microbiol* **60**:553-562.
- Buttner, C. R., G. R. Cornelis, D. W. Heinz, and H. H. Niemann.** 2005. Crystal structure of *Yersinia enterocolitica* type III secretion chaperone SycT. *Protein Sci.* **14**:1993-2002.
- Cabezón, E., J. I. Sastre, and F. de la Cruz.** 1997. Genetic evidence of a coupling role for the TraG protein family in bacterial conjugation. *Mol. Gen. Genet.* **254**:400-406.
- Cascales, E., and P. J. Christie.** 2003. The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat. Rev. Microbiol.* **1**:137-149.
- Cascales, E., and P.J. Christie.** 2004a. Definition of a bacterial type IV secretion pathway for a DNA substrate. *Science* **304**:1170-1173.
- Cascales, E., and P. J. Christie.** 2004b. *Agrobacterium* VirB10, an ATP energy sensor required for type IV secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:17228-17233.
- Cattaneo, M., C. Canton, A. Albertini, and I. Biunno.** 2004. Identification of a region within SEL1L protein required for tumour growth inhibition. *Gene* **326**:149-156.
- Cendron, L., A. Seydel, A. Angelini, R. Battistutta, and G. Zanotti.** 2004. Crystal structure of CagZ, a protein from the *Helicobacter pylori* pathogenicity island that encodes for a type IV secretion system. *J Mol. Biol.* **340**: 881-889.
- Censini, S., C. Lange, Z. Xiang, J. E. Crabtree, P. Ghiara, M. Borodovsky, R. Rappuoli, and A. Covacci.** 1996. *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:14648-14653.
- Chen, L., C. M. Li, and E. W. Nester.** 2000. Transferred DNA (T-DNA)-associated proteins of *Agrobacterium tumefaciens* are exported independently of virB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**:7545-7550.
- Christie, P. J., K. Atmakuri, V. Krishnamoorthy, S. Jakubowski, and E. Cascales.** 2005. Biogenesis, Architecture, and Function of Bacterial Type IV Secretion Systems. *Annu. Rev. Microbiol.* **59**:451-485.
- Christie, P. J. and J. P. Vogel.** 2000. Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol.* **8**:354-360.
- Cirillo, S.L., J. Lum, and J.D. Cirillo.** 2000. Identification of novel loci involved in entry by *Legionella pneumophila*. *Microbiology* **146**:1345-1359.

- Clark, J. M. and R. L. Swika.** 1977. Experimental biochemistry. W.H. Freeman and Company, San Francisco.
- Cohn, M.T., H. Ingmer, F. Mulholland, K. Jørgensen, J.M. Wells, and L. Brøndsted.** 2007. Contribution of conserved ATP-dependent proteases of *Campylobacter jejuni* to stress tolerance and virulence. Appl Environ Microbiol **73**:7803-7813.
- Cornelis, G.R.** 2002. The *Yersinia* YSC-YOP 'Type III' weaponry. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. **3**:742-752.
- Cornelis, G.R.** 2006. The type III secretion injectisome. Nat. Rev. Microbiol. **4**:811-825.
- Correa, P. and J. Houghton.** 2007. Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*. Gastroenterology **133**:659-672.
- Couturier, M. R., E. Tasca, C. Montecucco, and M. Stein.** 2006. Interaction with CagF is required for translocation of CagA into the host via the *Helicobacter pylori* type IV secretion system. Infect. Immun. **74**:273–281.
- Covacci, A., S. Censini, M. Bugnoli, R. Petracca, D. Burroni, G. Macchia, A. Massone, E. Papini, Z. Xiang, N. Figura, and .** 1993. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A **90**:5791-5795.
- Covacci, A., J. L. Telford, G. Del Giudice, J. Parsonnet, and R. Rappuoli.** 1999. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. Science **284**:1328-1333.
- Cover, T. L. and S. R. Blanke.** 2005. *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. Nat. Rev. Microbiol **3**:320-332.
- Cover, T.L., U. S. Krishna, D.A. Israel, and R. M. J. Peek.** 2003. Induction of gastric epithelial cell apoptosis by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. Cancer Res. **63**:951-957.
- Craanen, M. E., P. Blok, W. Dekker, and G. N. Tytgat.** 1994. *Helicobacter pylori* and early gastric cancer. Gut **35**:1372-1374.
- Crabtree, J. E., J. I. Wyatt, G. M. Sobala, G. Miller, D. S. Tompkins, J. N. Primrose, and A. G. Morgan.** 1993. Systemic and mucosal humoral responses to *Helicobacter pylori* in gastric cancer. Gut **34**:1339-1343.
- Crabtree, J. E., J. I. Wyatt, L. K. Trejdosiwicz, P. Peichl, P. H. Nichols, N. Ramsay, J. N. Primrose, and I. J. Lindley.** 1994. Interleukin-8 expression in *Helicobacter pylori* infected, normal, and neoplastic gastroduodenal mucosa. J Clin Pathol. **47**:61-66.
- Crabtree, J. E., Z. Xiang, I. J. Lindley, D. S. Tompkins, R. Rappuoli, and A. Covacci.** 1995. Induction of interleukin-8 secretion from gastric epithelial cells by a cagA negative isogenic mutant of *Helicobacter pylori*. J Clin Pathol. **48**:967-969.

Cryer, D. R., R. Eccleshall, and J. Marmur. 1975. Isolation of yeast DNA. *Methods Cell Biol.* **12**:39-44.

Dailidienė, D., G. Dailidienė, K. Ogura, M. Zhang, A. K. Mukhopadhyay, K. A. Eaton, G. Cattoli, J. G. Kusters, and D. E. Berg. 2004. *Helicobacter acinonychis*: genetic and rodent infection studies of a *Helicobacter pylori*-like gastric pathogen of cheetahs and other big cats. *J. Bacteriol.* **186**:356-365.

Das, A., and Y. H. Xie. 2000. The *Agrobacterium* T-DNA transport pore proteins VirB8, VirB9, and VirB10 interact with one another. *J. Bacteriol.* **182**:758-763.

DeBord, K. L., N. S. Galanopoulos, and O. Schneewind. 2003. The *ttsA* gene is required for low-calcium-induced type III secretion of Yop proteins and virulence of *Yersinia enterocolitica* W22703. *J. Bacteriol.* **185**:3499-3507.

Dehio, M., O.G. Gomez-Duarte, C. Dehio, and T.F. Meyer. 1998a. Vitronectin-dependent invasion of epithelial cells by *Neisseria gonorrhoeae* involves α_5 integrin receptors. *FEBS Letters* **424**:84-88.

Dehio, C., S.D. Gray-Owen, and T.F. Meyer. 1998b. The role of neisserial Opa proteins in interactions with host cells. *Trends in Microbiology* **6**:489-495.

Delahay, R. M., and G. Frankel. 2002. Coiled-coil proteins associated with type III secretion systems: a versatile domain revisited. *Mol. Microbiol.* **45**:905-916.

D'Elia, M. M., A. Amedei, and G. Del Prete. 2003. *Helicobacter pylori* antigen-specific T-cell responses at gastric level in chronic gastritis, peptic ulcer, gastric cancer and low-grade mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma. *Microbes Infect.* **5**:723-730.

D'Elia, M. M., M. Manghetti, C. M. De, F. Costa, C. T. Baldari, D. Burrone, J. L. Telford, S. Romagnani, and G. Del Prete. 1997. T helper 1 effector cells specific for *Helicobacter pylori* in the gastric antrum of patients with peptic ulcer disease. *J. Immunol.* **158**:962-967.

Del Prete, G. 1998. The concept of type-1 and type-2 helper T cells and their cytokines in humans. *Int. Rev. Immunol.* **16**:427-455.

Deng, W., L. Chen, W. T. Peng, X. Liang, S. Sekiguchi, M. P. Gordon, L. Comai, and E. W. Nester. 1999. VirE1 is a specific molecular chaperone for the exported single-stranded-DNA-binding protein VirE2 in *Agrobacterium*. *Mol. Microbiol.* **31**:1795-1807.

Ditta, G., S. Stanfield, D. Corbin, and D. R. Helinski. 1980. Broad host range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: Construction of a Gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**:7347-7351.

Dixon, M. F. 2001. Prospects for intervention in gastric carcinogenesis: reversibility of gastric atrophy and intestinal metaplasia. *Gut* **49**:2-4.

Doig, P., and T. J. Trust. 1994. Identification of surface-exposed outer membrane antigens of *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **62**:4526-4533.

- Dong, J.-H., J.-F. Wen, and H.-F. Tian.** 2007. Homologs of eukaryotic ras superfamily proteins in prokaryotes and their novel phylogenetic correlation with their eukaryotic analogs. *Gene* **396**:116-124.
- Drumm, B., G. I. Perez-Perez, M. J. Blaser, and P. M. Sherman.** 1990. Intrafamilial clustering of *Helicobacter pylori* infection. *N. Engl. J Med* **322**:359-363.
- Du, R. J., and B. Ho.** 2003. Surface localized heat shock protein 20 (HslV) of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* **8**:257-267.
- Dunn, B.E., G. P. Campbell, G. I. Perez-Perez, and M. J. Blaser.** 1990. Purification and characterization of urease from *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.* **255**:9464-9469.
- Dunn, B. E., H. Cohen, and M. J. Blaser.** 1997. *Helicobacter pylori*. *Clin. Microbiol Rev.* **10**:720-741.
- Eaton, K. A., C. L. Brooks, D. R. Morgan, and S. Krakowka.** 1991. Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect Immun.* **59**:2470-2475.
- Eaton, K. A., D. R. Morgan, and S. Krakowka.** 1992. Motility as a factor in the colonisation of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol* **37**:123-127.
- Eisenbrandt, R., M. Kalkum, E. M. Lai, R. Lurz, C. I. Kado, and E. Lanka.** 1999. Conjugative pili of IncP plasmids, and the Ti plasmid T pilus are composed of cyclic subunits. *J. Biol. Chem.* **274**:22548–22555.
- Eitel, J., and P. Dersch.** 2002. The YadA protein of *Yersinia pseudotuberculosis* mediates high-efficiency uptake into human cells under environmental conditions in which invasin is repressed. *Infect Immun* **70**:4880-4891.
- El-Omar, E. M., M. Carrington, W. H. Chow, K. E. McColl, J. H. Bream, H. A. Young, J. Herrera, J. Lissowska, C. C. Yuan, N. Rothman, G. Lanyon, M. Martin, J. F. Fraumeni, Jr., and C. S. Rabkin.** 2000. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* **404**:398-402.
- El Tahir, Y., and M. Skurnik.** 2001. YadA, the multifaceted *Yersinia* adhesin. *Int J Med Microbiol* **291**:209-218.
- Ermak, T.H., P. J. Giannasca, R. Nichols, G. A. Myers, J. Nedrud, R. Weltzin, C. K. Lee, H. Kleanthous, and T. P. Monath.** 1998. Immunization of mice with urease vaccine affords protection against *Helicobacter pylori* infection in the absence of antibodies and is mediated by MHC class II-restricted responses. *J. Exp. Med.* **188**:2277-2288.
- Falush, D., T. Wirth, B. Linz, J. K. Pritchard, M. Stephens, M. Kidd, M. J. Blaser, D. Y. Graham, S. Vacher, G. I. Perez-Perez, Y. Yamaoka, F. Megraud, K. Otto, U. Reichard, E. Katzowitsch, X. Wang, M. Achtman, and S. Suerbaum.** 2003. Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science* **299**:1582-1585.
- Feldman, M. F. and G. R. Cornelis.** 2003. The multitasking type III chaperones: all you can do with 15 kDa. *FEMS Microbiol Lett* **219**:151-158.

- Fernandez, D., T. A. T. Dang, G. M. Spudich, X.-R. Zhou, B. R. Berger, and P. J. Christie.** 1996a. The *Agrobacterium tumefaciens* *virB7* gene product, a proposed component of the T-complex transport apparatus, is a membrane-associated lipoprotein exposed at the periplasmic surface. *J. Bacteriol.* **178**:3156–3167.
- Fernandez, D., G. M. Spudich, X. R. Zhou, and P. J. Christie.** 1996b. The *Agrobacterium tumefaciens* VirB7 lipoprotein is required for stabilization of VirB proteins during assembly of the T-complex transport apparatus. *J. Bacteriol.* **178**:3168–3176.
- Fetherston, J. D., P. Schuetze, and R. D. Perry.** 1992. Loss of the pigmentation phenotype in *Yersinia pestis* is due to the spontaneous deletion of 102 kb of chromosomal DNA which is flanked by a repetitive element. *Mol. Microbiol.* **6**:2693–2704.
- Fischer, W.** 2004. Proteinsekretionssysteme bei *Helicobacter pylori*: Wirkungsweise und Bedeutung für die Pathogenese. Habilitationsschrift aus dem Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie, Lehrstuhl für Bakteriologie.
- Fischer, W., R. Buhrdorf, E. Gerland, and R. Haas.** 2001a. Outer membrane targeting of passenger proteins by the vacuolating cytotoxin autotransporter of *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **69**:6769–6775.
- Fischer, W. and R. Haas.** 2004. The RecA protein of *Helicobacter pylori* requires a posttranslational modification for full activity. *J. Bacteriol.* **186**:777–784.
- Fischer, W., J. Püls, R. Buhrdorf, B. Gebert, S. Odenbreit, and R. Haas.** 2001b. Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Mol. Microbiol.* **42**:1337–1348. (Erratum, **47**:1759, 2003.)
- Fox, J.G., B. M. Edriss, E. B. Cabot, C. Beaucage, J. C. Murphy, and K. S. Probst.** 1986. *Campylobacter*-like organisms isolated from gastric mucosa of ferrets. *Am. J. Vet. Res.* **47**:236–239.
- Franco, A.T., D. A. Israel, M. K. Washington, U. Krishna, J. G. Fox, A. B. Rogers, A.S. Neish, L. Collier-Hyams, G.I. Perez-Perez, M. Hatakeyama, R. Whitehead, K. Gaus, D.P. O'Brien, J. Romero-Gallo, and R.M. Peek Jr.** 2005. Activation of beta-catenin by carcinogenic *Helicobacter pylori*. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **102**:10646–10651.
- Frees, D., S. N. Qazi, P. J. Hill, and H. Ingmer.** 2003. Alternative roles of ClpX and ClpP in *Staphylococcus aureus* stress tolerance and virulence. *Mol Microbiol* **48**:1565–1578.
- Frees, D., K. Sorensen, and H. Ingmer.** 2005. Global virulence regulation in *Staphylococcus aureus*: pinpointing the roles of ClpP and ClpX in the *sar/agr* regulatory network. *Infect Immun* **73**:8100–8108.
- Fronzes, R., E. Schäfer, L. Wang, H. R. Saibil, E. V. Orlova, and G. Waksman.** 2009. Structure of a type IV secretion system core complex. *Science* **323**:266–268.

- Gaillot, O., E. Pellegrini, S. Bregenholt, S. Nair, and P. Berche.** 2000. The ClpP serine protease is essential for the intracellular parasitism and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **35**:1286–1294.
- Galli, D. M., J. Chen, K. F. Novak, and D. J. Leblanc.** 2001. Nucleotide sequence and analysis of conjugative plasmid pVT745. *J. Bacteriol.* **183**:1585–1594.
- Galmiche, A., J. Rassow, A. Doye, S. Cagnol, J. C. Chambard, S. Contamin, V. de Thillot, I. Just, V. Ricci, E. Solcia, E. Van Obberghen, and P. Boquet.** 2000. The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release. *EMBO J.* **19**:6361–6370.
- Gebert, B., W. Fischer, E. Weiss, R. Hoffmann, and R. Haas.** 2003. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science* **301**:1099–1102.
- Gerhard, M., N. Lehn, N. Neumayer, T. Boren, R. Rad, W. Schepp, S. Miehke, M. Classen, and C. Prinz.** 1999. Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**:12778–12783.
- Giancotti, F. G., and E. Ruoslahti.** 1999. Integrin signaling. *Science* **285**:1028–1032.
- Gilmour, M. W., J. E. Gunton, T. D. Lawley, and D. E. Taylor.** 2003. Interaction between the IncHI1 plasmid R27 coupling protein and type IV secretion system: TraG associates with the coiled-coil mating pair formation protein TrhB. *Mol. Microbiol.* **49**:105–116.
- Gomez-Duarte, O. G., M. Dehio, C. A. Guzman, G. S. Chhatwal, C. Dehio, and T. F. Meyer.** 1997. Binding of vitronectin to Opa-expressing *Neisseria gonorrhoeae* mediates invasion of HeLa cells. *Infect Immun* **65**:3857–3866.
- Gomis-Ruth, F. X., G. Moncalian, F. de la Cruz, and M. Coll.** 2002. Conjugative plasmid protein TrwB, an integral membrane type IV secretion system coupling protein. Detailed structural features and mapping of the active site cleft. *J Biol. Chem.* **277**:7556–7566.
- Goodwin, C. S., J. A. Armstrong, T. Chilvers, M. Peters, M. D. Collins, L. Sly, W. McConnel, and W. E. S. Harper.** 1989. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**:397–405.
- Grahn, A. M., J. Haase, D. H. Bamford, and E. Lanka.** 2000. Components of the RP4 conjugative transfer apparatus form an envelope structure bridging inner and outer membranes of donor cells: implications for related macromolecule transport systems. *J. Bacteriol.* **182**:1564–1574.
- Grant, B., and I. Greenwald.** 1996. The *Caenorhabditis elegans sel-1* gene, a negative regulator of *lin-12* and *glp-1*, encodes a predicted extracellular protein. *Genetics* **143**:237–247.
- Groll, M., M. Bochtler, H. Brandstetter, T. Clausen, and R. Huber.** 2005. Molecular machines for protein degradation. *Chembiochem* **6**:222–256.

- Guilvout, I., M. Chami, A. Engel, A. P. Pugsley, and N. Bayan.** 2006. Bacterial outer membrane secretin PulD assembles and inserts into the inner membrane in the absence of its pilotin. *EMBO J.* **25**:5241–5249.
- Haas, R., A. F. Kahrs, D. Facius, H. Allmeier, R. Schmitt, and T. F. Meyer.** 1993. TnMax-a versatile mini-transposon for the analysis of cloned genes and shuttle mutagenesis. *Gene* **130**:23-31.
- Hacker, J., G. Blum-Oehler, I. Mühldorfer, and H. Tschape.** 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol. Microbiol* **23**:1089-1097.
- Hamilton, C. M., H. Lee, P. L. Li, D. M. Cook, K. R. Piper, S. B. von Bodman, E. Lanka, W. Ream, and S. K. Farrand.** 2000. TraG from RP4 and TraG and VirD4 from Ti plasmids confer relaxosome specificity to the conjugal transfer system of pTiC58. *J. Bacteriol.* **182**:1541-1548.
- Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol. Biol.* **166**:557-580.
- Hapfelmeier, S., N. Domke, P. C. Zambryski, and C. Baron.** 2000. VirB6 is required for stabilization of VirB5, VirB3 and formation of VirB7 homodimers in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **182**:4505–4511.
- Hare, S., W. Fischer, R. Williams, L. Terradot, R. Bayliss, R. Haas, and G. Waksman.** 2007. Identification, structure and mode of action of a new regulator of the *Helicobacter pylori* HP0525 ATPase. *EMBO* **26**:4926-4934.
- Harris, R. L., V. Hombs, and P. M. Silverman.** 2001. Evidence that F-plasmid proteins TraV, TraK and TraB assemble into an envelope-spanning structure in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **42**:757-766.
- Hartzell, P. L.** 1997. Complementation of sporulation and motility defects in a prokaryote by a eukaryotic GTPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**:9881-9886.
- Hauck, C. R.** 2002. Cell adhesion receptors-signaling capacity and exploitation by bacterial pathogens. *Med. Microbiol. Immunol.* **191**:55-62.
- Heilmann, K. L. and F. Borchard.** 1991. Gastritis due to spiral shaped bacteria other than *Helicobacter pylori*: clinical, histological, and ultrastructural findings. *Gut* **32**:137-140.
- Henderson, I. R., F. Navarro-Garcia, M. Desvaux, R. C. Fernandez, and D. Ala'Aldeen.** 2004. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**:692–744.
- Hessey, S. J., J. Spencer, J. I. Wyatt, G. Sobala, B. J. Rathbone, A. T. Axon, and M. F. Dixon.** 1990. Bacterial adhesion and disease activity in *Helicobacter* associated chronic gastritis. *Gut* **31**:134-138.
- Higashi, H., A. Nakaya, R. Tsutsumi, K. Yokoyama, Y. Fujii, S. Ishikawa, S., M. Higuchi, A. Takahashi, Y. Kurashima, Y. Teishikata, S. Tanaka, T. Azuma, and M.**

- Hatakeyama.** 2004. *H. pylori* CagA induces Ras-independent morphogenetic response through SHP-2 recruitment and activation. *J Biol Chem* **279**:17205–17216.
- Higashi, H., R. Tsutsumi, A. Fujita, S. Yamazaki, M. Asaka, T. Azuma, and M. Hatakeyama.** 2002a. Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:14428–14433.
- Higashi, H., R. Tsutsumi, S. Muto, T. Sugiyama, T. Azuma, M. Asaka, and M. Hatakeyama.** 2002b. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *H. pylori* CagA Protein. *Science* **295**:683–686.
- Higashi, H., K. Yokoyama, Y. Fujii, S. Ren, H. Yuasa, I. Saadat, N. Murata-Kamiya, T. Azuma, and M. Hatakeyama.** 2005. EPIYA motif is a membrane-targeting signal of *Helicobacter pylori* virulence factor CagA in mammalian cells. *J Biol. Chem.* **280**:23130–23137.
- Hofreuter, D., A. Karnholz, and R. Haas.** 2003. Topology and membrane interaction of *Helicobacter pylori* ComB proteins involved in natural transformation competence. *Int. J. Med. Microbiol.* **293**:153–165.
- Hofreuter, D., S. Odenbreit, and R. Haas.** 2001. Natural transformation competence in *Helicobacter pylori* is mediated by the basic components of a type IV secretion system. *Mol. Microbiol.* **41**:379–391.
- Hohlfeld, S., I. Pattis, J. Püls, G. V. Plano, R. Haas, and W. Fischer.** 2006. A C-terminal translocation signal is necessary, but not sufficient for type IV secretion of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Mol. Microbiol* **59**:1624–1637.
- Holland, I. B., L. Schmitt, and J. Young.** 2005. Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway (Review). *Mol. Membr. Biol.* **22**:29–39.
- Holmes, D. S. and M. Quigley.** 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**:193–197.
- Höppner, C., A. Carle, D. Sivanesan, S. Hoepfner, and C. Baron.** 2005. The putative lytic transglycosylase VirB1 from *Brucella suis* interacts with the type IV secretion system core components VirB8, VirB9 and VirB11. *Microbiology* **151**:3469–3482.
- Höppner, C., Z. Liu, N. Domke, A. N. Binns, and C. Baron.** 2004. VirB1 orthologs from *Brucella suis* and pKM101 complement defects of the lytic transglycosylase required for efficient type IV secretion from *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **186**:1415–1422.
- Hueck, C.J.** 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:379–433.
- Hynes, R.O.** 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signalling machines. *Cell* **110**:673–687.
- Ilver, D., A. Arnqvist, J. Ogren, I. M. Frick, D. Kersulyte, E. T. Incecik, D. E. Berg, A. Covacci, L. Engstrand, and T. Boren.** 1998. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science* **279**:373–377.

- Inoue, K., J. Chen, Q. Tan, and M. Inouye.** 2006. Era and RbfA have overlapping function in ribosome biogenesis in *Escherichia coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **11**:41–52.
- Isberg, R. R., Z. Hamburger, and P. Dersch.** 2000. Signaling and invasin-promoted uptake via integrin receptors. *Microbes Infect* **2**:793–801.
- Isberg, R. R., D.L. Voorhis, and S. Falkow.** 1987. Identification of invasin: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells. *Cell* **50**:769–778.
- Israel, D. A., A. S. Lou, and M. J. Blaser.** 2000. Characteristics of *Helicobacter pylori* natural transformation. *FEMS Microbiol. Lett.* **186**:275–280.
- Jackson, M.W., E. Silva-Herzog, and G.V. Plano.** 2004. The ATP-dependent ClpXP and Lon proteases regulate expression of the *Yersinia pestis* type III secretion system via regulated proteolysis of YmoA, a small histone-like protein. *Mol Microbiol* **54**:1364–1378.
- Jakubowski, S. J., E. Cascales, V. Krishnamoorthy, and P. J. Christie.** 2005. *Agrobacterium tumefaciens* VirB9, an outer-membrane-associated component of a type IV secretion system, regulates substrate selection and T-pilus biogenesis. *J. Bacteriol.* **187**:3486–3495.
- Jakubowski, S. J., V. Krishnamoorthy, E. Cascales, and P. J. Christie.** 2004. *Agrobacterium tumefaciens* VirB6 domains direct the ordered export of a DNA substrate through a type IV secretion system. *J. Mol. Biol.* **341**:961-977.
- Jiménez-Soto, L. F., X. Sewald, S. Kutter, C. Ertl, E. Weiss, U. Kapp, M. Rohde, T. Pirch, K. Jung, L. Terradot, W. Fischer, and R. Haas.** 2009. *Helicobacter pylori* type IV secretion apparatus exploits $\beta 1$ integrin in a novel RGD-independent manner. *J. Exp. Med.*, Submitted.
- Johnson, T. L., J. Abendroth, W. G. Hol, and M. Sandkvist.** 2006. Type II secretion: from structure to function. *FEMS Microbiol. Lett.* **255**:175–186.
- Jones, A.C., R. P. H. Logan, S. Foynes, A. Cockayne, B. W. Wren, and C. W. Penn.** 1997. A flagellar sheath protein of *Helicobacter pylori* is identical to HpaA, a putative N-acetylneuraminyllactose-binding hemagglutinin, but is not an adhesin for AGS Cells. *J. Bacteriol.* **179**:5643-5647.
- Jones, A.L., K. Shirasu, and C.I. Kado.** 1994. The product of the *virB4* gene of *Agrobacterium tumefaciens* promotes accumulation of VirB3 protein. *J. Bacteriol.* **176**:5255–5261.
- Judd, P. K., R. B. Kumar, and A. Das.** 2005a. The type IV secretion apparatus protein VirB6 of *Agrobacterium tumefaciens* localizes to a cell pole. *Mol. Microbiol.* **55**:115-124.
- Judd, P. K., D. Mahli, and A. Das.** 2005b. Molecular characterization of the *Agrobacterium tumefaciens* DNA transfer protein VirB6. *Microbiology* **151**:3483-3492.

- Kahrs, A.F., S. Odenbreit, W. Schmitt, D. Heuermann, T.F. Meyer, und R. Haas.** 1995. An Improved *TnMax* mini-transposon system suitable for sequencing, shuttle mutagenesis and gene fusions. *Gene* **167**:53-57.
- Kaiser, D.** 2008. *Myxococcus*-from single-cell polarity to complex multicellular patterns. *Annu. Rev. Genet.* **42**:109–30.
- Kalkum, M., R. Eisenbrandt, R. Lurz, and E. Lanka.** 2002. Tying rings for sex. *Trends Microbiol.* **10**:382–387.
- Karita, M., M. K. Tummuru, H. P. Wirth, and M. J. Blaser.** 1996. Effect of growth phase and acid shock on *Helicobacter pylori* *cagA* expression. *Infect. Immun.* **64**:4501-4507.
- Karnoub, A. E., and R. A. Weinberg.** 2008. Ras oncogenes: split personalities. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**:517-531.
- Kersulyte, D., B. Velapatiño, A. K. Mukhopadhyay, L. Cahuayme, A. Bussalleu, J. Combe, R. H. Gilman, and D. E. Berg.** 2003. Cluster of type IV secretion genes in *Helicobacter pylori*'s plasticity zone. *J. Bacteriol.* **185**:3764–3772.
- Koster, M., W. Bitter, H. de Cock, A. Allaoui, G. R. Cornelis, and J. Tommassen.** 1997. The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of *Yersinia enterocolitica* forms a ring-shaped multimeric complex. *Mol. Microbiol.* **26**:789-797.
- Krall, L., U. Wiedemann, G. Unsin, S. Weiss, N. Domke and C. Baron.** 2002. Detergent extraction identifies different VirB protein subassemblies of the type IV secretion machinery in the membranes of *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**:11405-11410.
- Krause, S., W. Pansegrau, R. Lurz, F. De La Cruz, and E. Lanka.** 2000. Enzymology of type IV macromolecule secretion systems: the conjugative transfer regions of plasmids RP4 and R388 and the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* encode structurally and functionally related nucleoside triphosphate hydrolases. *J. Bacteriol.* **182**:2761–2770.
- Krogh, A., B. Larsson, G. von Heijne, and E. L. Sonnhammer.** 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* **305**:567–580.
- Kuck, D., B. Kolmerer, C. Iking-Konert, P. H. Krammer, W. Stremmel, and J. Rudi.** 2001. Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* induces apoptosis in the human gastric epithelial cell line AGS. *Infect. Immun.* **69**:5080-5087.
- Kutter, S., R. Buhrdorf, J. Haas, W. Schneider-Brachert, R. Haas, and W. Fischer.** 2008. Protein subassemblies of the *cag* type IV secretion system revealed by localization and interaction studies. *J. Bacteriol.* **190**:2161-2171.
- Kwok, T., D. Zabler, S. Urman, M. Rohde, R. Hartig, S. Wessler, R. Misselwitz, J. Berger, N. Sewald, W. König, and S. Backert.** 2007. *Helicobacter* exploits integrin for type IV secretion and kinase activation. *Nature* **449**:862–866.
- Lai, E.-M., and C. I. Kado.** 1998. Processed VirB2 is the major subunit of the promiscuous pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **180**:2711–2717.

- Lambert, J. R., S. K. Lin, W. Sievert, L. Nicholson, M. Schembri, and C. Guest.** 1995. High prevalence of *Helicobacter pylori* antibodies in an institutionalized population: evidence for person-to-person transmission. *Am. J Gastroenterol.* **90**:2167-2
- Lau-Wong, I. C., T. Locke, M. J. Ellison, T. L. Raivio, and L. S. Frost.** 2008. Activation of the Cpx regulon destabilizes the F plasmid transfer activator, TraJ, via the HslVU protease in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **67**:516-527.
- Lawley, T. D., W. A. Klimke, M. J. Gubbins, and L. S. Frost.** 2003. F factor conjugation is a true type IV secretion system. *FEMS Microbiol. Lett.* **224**:1-15.
- Lee, A., J. Fox, and S. Hazell.** 1993. Pathogenicity of *Helicobacter pylori*: a perspective. *Infect Immun.* **61**:1601-1610.
- Lee, A., S. L. Hazell, J. O'Rourke, and S. Kouprach.** 1988. Isolation of a spiral-shaped bacterium from the cat stomach. *Infect. Immun.* **56**:2843-2850.
- Leipe, D. D., Y. I. Wolf, E. V. Koonin, and L. Aravind.** 2002. Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *J. Mol. Biol.* **317**:41-72.
- Letzelter, M., I. Sorg, L. J. Mota, S. Meyer, J. Stalder, M. Feldman, M. Kuhn, I. Callebaut, and G. R. Cornelis.** 2006. The discovery of SycO highlights a new function for type III secretion effector chaperones. *EMBO J* **25**:3223-3233.
- Leunk, R. D., P. T. Johnson, B. C. David, W. G. Kraft, and D. R. Morgan.** 1988. Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J Med Microbiol* **26**:93-99.
- Leying, H., S. Suerbaum, G. Geis, and R. Haas.** 1992. Cloning and genetic characterization of a *Helicobacter pylori* flagellin gene. *Mol. Microbiol* **6**:2863-2874.
- Lindholm, C., M. Quiding-Jarbrink, H. Lonroth, A. Hamlet, and A. M. Svennerholm.** 1998. Local cytokine response in *Helicobacter pylori*-infected subjects. *Infect. Immun.* **66**:5964-5971.
- Linz, B., F. Balloux, Y. Moodley, A. Manica, H. Liu, P. Roumagnac, D. Falush, C. Stamer, F. Prugnolle, S. W. van der Merwe, Y. Yamaoka, D. Y. Graham, E. Perez-Trallero, T. Wadstrom, S. Suerbaum, and M. Achtman.** 2007. An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature* **445**:915-918.
- Liu, G., T. K. McDaniel, S. Falkow, and S. Karlin.** 1999. Sequence anomalies in the *cag7* gene of the *Helicobacter pylori* pathogenicity island. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:7011-7016.
- Llosa, M., F. X. Gomis-Ruth, M. Coll, and F. F. de la Cruz.** 2002. Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Mol. Microbiol* **45**:1-8.
- Llosa, M., S. Zunzunegui, and F. de la Cruz.** 2003. Conjugative coupling proteins interact with cognate and heterologous VirB10-like proteins while exhibiting specificity for cognate relaxosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**:10465-10470.

- Logan, R. P.** 1994. *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Lancet* **344**:1078-1079.
- Loh, J. T., V. J. Torres, and T. L. Cover.** 2007. Regulation of *Helicobacter pylori cagA* expression in response to salt. *Cancer Res.* **67**:4709-4715.
- Long, J. C., S. Wang, and S. B. Vik.** 1998. Membrane topology of Subunit a of the F₁F₀ ATP synthase as determined by labelling of unique cysteine residues. *J. Biol. Chem.* **273**:16235-16240.
- Lucas, B., D. Bumann, A. Walduck, J. Koesling, L. Develioglu, T. F. Meyer, and T. Aebischer.** 2001. Adoptive transfer of CD4⁺ T cells specific for subunit A of *Helicobacter pylori* urease reduces *H. pylori* stomach colonization in mice in the absence of interleukin-4 (IL-4)/IL-13 receptor signaling. *Infect. Immun.* **69**:1714-1721.
- Lupas, A., M. Van Dyke, and J. Stock.** 1991. Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* **252**:1162-1164.
- Macnab, R.M.** (1999) The bacterial flagellum: reversible rotary propellor and type III export apparatus. *J. Bacteriol.* **181**:7149-7153.
- Mahdavi, J., B. Sonden, M. Hurtig, F. O. Olfat, L. Forsberg, N. Roche, J. Angström, T. Larsson, S. Teneberg, K. A. Karlsson, S. Altraja, T. Wadström, D. Kersulyte, D. E. Berg, A. Dubois, C. Petersson, K. E. Magnusson, T. Norberg, F. Lindh, B. B. Lundskog, A. Arnqvist, L. Hammarström, and T. Boren.** 2002. *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science* **297**:573-578.
- Malaty, H. M., D. G. Evans, D. J. Evans, Jr., and D. Y. Graham.** 1992. *Helicobacter pylori* in Hispanics: comparison with blacks and whites of similar age and socioeconomic class. *Gastroenterology* **103**:813-816.
- Malaty, H. M. and D. Y. Graham.** 1994. Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Gut* **35**:742-745.
- Marmur J.** 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleotide acid from microorganisms. *J Mol Biol* **3**:208-218.
- Marshall, B. J., J. A. Armstrong, D. B. McGeachie, and R. J. Glancy.** 1985. Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. *Med. J. Aust.* **142**:436-439.
- Marshall, B. J. and J. R. Warren.** 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* **1**:1311-1315.
- Marshall, D. G., W. G. Dundon, S. M. Beesley, and C.J. Smyth.** 1998. *Helicobacter pylori*-a conundrum of genetic diversity. *Microbiology.* **144**:2925-2939.
- Marshall, T. and K. M. Williams.** 1992. Coomassie blue protein dye-binding assays measure formation of an insoluble protein-dye complex. *Anal. Biochem.* **204**:107-109.

- Mattsson, A., M. Quiding-Jarbrink, H. Lonroth, A. Hamlet, I. Ahlstedt, and A. Svennerholm.** 1998a. Antibody-secreting cells in the stomachs of symptomatic and asymptomatic *Helicobacter pylori*-infected subjects. *Infect. Immun.* **66**:2705-2712.
- Mattsson, A., A. Tinnert, A. Hamlet, H. Lonroth, I. Bolin, and A. M. Svennerholm.** 1998b. Specific antibodies in sera and gastric aspirates of symptomatic and asymptomatic *Helicobacter pylori*-infected subjects. *Clin Diagn. Lab Immunol.* **5**:288-293.
- McClain, M. S., P. Cao, H. Iwamoto, A. D. Vinion-Dubiel, G. Szabo, Z. Shao, and T. L. Cover.** 2001. A 12-amino-acid segment, present in type s2 but not type s1 *Helicobacter pylori* VacA proteins, abolishes cytotoxin activity and alters membrane channel formation. *J. Bacteriol.* **183**:6499-6508.
- McGee, D. J., C. A. May, R. M. Garner, J. M. Himpfl, and H. L. T. Mobley.** 1999. Isolation of *Helicobacter pylori* genes that modulate urease activity. *J. Bacteriol.* **181**:2477-2484.
- McNulty, S. L., B. M. Mole, D. Dailidienė, I. Segal, R. Ally, R. Mistry, O. Secka, R. A. Adegbola, J. E. Thomas, E. M. Lenarcic, R. M. Peek, Jr., D. E. Berg, and M. H. Forsyth.** 2004. Novel 180- and 480-base-pair insertions in African and African-American strains of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* **42**:5658-5663.
- Merrell, D.S., M. L. Goodrich, G. Otto, L. S. Tompkins, and S. Falkow.** 2003. pH-regulated gene expression of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **71**:3529-3539.
- Messing, J., and J. Vieira.** 1982. A new pair of M13 vectors for selecting either DNA strand of double-digest restriction fragments. *Biotechnology* **24**:202-209.
- Miller, V. L., and S. Falkow.** 1988. Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells. *Infect Immun* **56**:1242-1248.
- Mimuro, H., T. Suzuki, J. Tanaka, M. Asahi, R. Haas, and C. Sasakawa.** 2002. Grb2 is a key mediator of *H. pylori* CagA protein activities. *Mol Cell* **10**:745-755.
- Mitchell, H. M., T. Bohane, R. A. Hawkes, and A. Lee.** 1993. *Helicobacter pylori* infection within families. *Zentralbl. Bakteriol.* **280**:128-136.
- Mittl, P. R. and W. Schneider-Brachert.** 2007. Sell-like repeat proteins in signal transduction. *Cell. Signal.* **19**:20-31.
- Moese, S., M. Selbach, V. Brinkmann, A. Karlas, B. Haimovich, S. Backert, and T. F. Meyer.** 2007. The *Helicobacter pylori* CagA protein disrupts matrix adhesion of gastric epithelial cells by dephosphorylation of vinculin. *Cell Microbiol* **9**:1148-1161.
- Moese, S., M. Selbach, T. Kwok, V. Brinkmann, W. König, T. F. Meyer, and S. Backert.** 2004. *Helicobacter pylori* induces AGS cell motility and elongation via independent signalling pathways. *Infect Immun* **72**:3646-3649.

- Molinari, M., M. Salio, C. Galli, N. Norais, R. Rappuoli, A. Lanzavecchia, and C. Montecucco.** 1998. Selective inhibition of Ii-dependent antigen presentation by *Helicobacter pylori* toxin VacA. *J. Exp. Med.* **187**:135-140.
- Morgner, A., N. Lehn, L. P. Andersen, C. Thiede, M. Bennedsen, K. Trebesius, B. Neubauer, A. Neubauer, M. Stolte, and E. Bayerdorffer.** 2000. *Helicobacter heilmannii*-associated primary gastric low-grade MALT lymphoma: complete remission after curing the infection. *Gastroenterol.* **118**:821-828.
- Mosmann, T. R. and S. Sad.** 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol. Today* **17**:138-146.
- Mougous, J. D., M. E. Cuff, S. Raunser, A. Shen, M. Zhou, C. A. Gifford, A. L. Goodman, G. Joachimiak, C. L. Ordoñez, S. Lory, T. Walz, A. Joachimiak, and J. J. Mekalanos.** 2006. A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science* **312**:1526–1530.
- Murata-Kamiya, N., Y. Kurashima, Y. Teishikata, Y. Yamahashi, Y. Saito, H. Higashi, H. Aburatani, T. Akiyama, R. M. Peek Jr, T. Azuma, and M. Hatakeyama.** 2007. *Helicobacter pylori* CagA interacts with E-cadherin and deregulates the beta-catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells. *Oncogene* **26**:4617–4626.
- Nair, S., E. Milohanic, and P. Berche.** 2000. ClpC ATPase is required for cell adhesion and invasion of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **68**:7061–7068.
- Naito, M., T. Yamazaki, R. Tsutsumi, H. Higashi, K. Onoe, S. Yamazaki, T. Azuma, and M. Hatakeyama.** 2006. Influence of EPIYA-repeat polymorphism on the phosphorylation-dependent biological activity of *Helicobacter pylori* CagA. *Gastroenterology* **130**:1181-1190.
- Nakai, K., and M. Kanehisa.** 1991. Expert system for predicting protein localization sites in gram-negative bacteria. *Proteins* **11**:95–110.
- Neuwald, A. F., L. Aravind, J. L. Spouge, and E. V. Koonin.** 1999. AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Research* **9**:27-43.
- Newton, H. J., F. M. Sansom, V. Bennett-Wood, and E. L. Hartland.** 2006. Identification of *Legionella pneumophila*-specific genes by genomic subtractive hybridization with *Legionella micdadei* and identification of *lpnE*, a gene required for efficient host cell entry. *Infect. Immun.* **74**:1683-1691.
- Neyt, C. and G. R. Cornelis.** 1999. Insertion of a Yop translocation pore into the macrophage plasma membrane by *Yersinia enterocolitica*: requirement for translocators YopB and YopD, but not LcrG. *Mol. Microbiol* **33**:971-981.
- Nielsen, H., J. Engelbrecht, S. Brunak, and G. von Heijne.** 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* **10**:1–6.

- Nomura, A. and G. N. Stemmermann.** 1993. *Helicobacter pylori* and gastric cancer. J Gastroenterol Hepatol **8**:294-303.
- Obert, S., R. J. O'Connor, S. Schmid, and P. Hearing.** 1994. The adenovirus E4-6/7 protein transactivates the E2 promoter by inducing dimerization of a heteromeric E2F complex. Mol. Cell Biol. **14**:1333-1346.
- Odenbreit, S., G. Faller, and R. Haas.** 2002. Role of the AlpAB proteins and lipopolysaccharide in adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. Int. J. Med. Microbiol. **292**:247-256.
- Odenbreit, S., B. Gebert, J. Püls, W. Fischer, and R. Haas.** 2001. Interaction of *Helicobacter pylori* with professional phagocytes: role of the cag pathogenicity island and translocation, phosphorylation and processing of CagA. Cell Microbiol. **3**:21-31.
- Odenbreit, S., J. Püls, B. Sedlmaier, E. Gerland, W. Fischer, and R. Haas.** 2000. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. Science **287**:1497-1500.
- Odenbreit, S., M. Till, D. Hofreuter, G. Faller, and R. Haas.** 1999. Genetic and functional characterization of the alpAB gene locus essential for the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. Mol. Microbiol. **31**:1537-1548.
- Ogura, N., J. C. Perez, P. R. Mittl, H.-K. Lee, G. Dailide, S. Tan, Y. Ito, O. Secka, D. Dailidienne, K. Putty, D. E. Berg, and A. Kalia.** 2007. *Helicobacter pylori* evolution: lineage-specific adaptations in homologs of eukaryotic *Sell*-like genes. PLoS Comput. Biol. **3**: e151. 1455-1467.
- Ohata, H., S. Kitauchi, N. Yoshimura, K. Mugitani, M. Iwane, H. Nakamura, A. Yoshikawa, K. Yanaoka, K. Arii, H. Tamai, Y. Shimizu, T. Takeshita, O. Mohara, and M. Ichinose.** 2004. Progression of chronic atrophic gastritis associated with *Helicobacter pylori* infection increases risk of gastric cancer. Int. J. Cancer **109**:138-143.
- Ohnishi, N., H. Yuasa, S. Tanaka, H. Sawa, M. Miura, A. Matsui, H. Higashi, M. Musashi, K. Iwabuchi, M. Suzuki, G. Yamada, T. Azuma, and M. Hatakeyama.** 2008. Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **105**:1003-1008.
- Ota, H., T. Katsuyama, S. Nakajima, H. El-Zimaity, J. G. Kim, D. Y. Graham, and R. M. Genta.** 1998a. Intestinal metaplasia with adherent *Helicobacter pylori*: a hybrid epithelium with both gastric and intestinal features. Hum. Pathol. **29**:846-850.
- Ota, H., J. Nakayama, M. Momose, M. Hayama, T. Akamatsu, T. Katsuyama, D. Y. Graham, and R. M. Genta.** 1998b. *Helicobacter pylori* infection produces reversible glycosylation changes to gastric mucins. Virchows Arch. **433**:419-426.
- Parkin, D. M.** 2006. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. Int J Cancer **118**:3030-3044.

- Parsonnet, J., S. Hansen, L. Rodriguez, A. B. Gelb, R. A. Warnke, E. Jellum, N. Orentreich, J. H. Vogelmann, and G. D. Friedman.** 1994. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *N. Engl. J Med* **330**:1267-1271.
- Parsons, J. T., K. H. Martin, J. K. Slack, J. M. Taylor, and S. A. Weed.** 2000. Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement. *Oncogene* **19**:5606–5613.
- Pattis, I., E. Weiss, R. Laugks, R. Haas, and W. Fischer.** 2007. The *Helicobacter pylori* CagF protein is a type IV secretion chaperone-like molecule that binds close to the C-terminal secretion signal of the CagA effector protein. *Microbiology* **153**:2896–2909.
- Pederson, K. J., S. Carlson, and D. E. Pierson.** 1997. The ClpP protein, a subunit of the Clp protease, modulates *ail* gene expression in *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* **26**:99–107.
- Peek, R. M., Jr.** 2002. *Helicobacter pylori* strain-specific modulation of gastric mucosal cellular turnover: implications for carcinogenesis. *J Gastroenterol* **37 Suppl 13**:10-16.
- Pflock, M., N. Finsterer, B. Joseph, H. Mollenkopf, T. F. Meyer, and D. Beier.** 2006. Characterization of the ArsRS regulon of *Helicobacter pylori*, involved in acid adaptation. *J. Bacteriol.* **188**:3449-3462.
- Polenghi, A., F. Bossi, F. Fischetti, P. Durigutto, A. Cabrelle, N. Tamassia, M. A. Cassatella, C. Montecucco, F. Tedesco, and M. de Bernard.** 2007. The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* crosses endothelia to promote neutrophil adhesion in vivo. *J Immunol.* **178**:1312-1320.
- Ponting, C. P.** 2000. Proteins of the endoplasmic-reticulum-associated degradation pathway: domain detection and function prediction. *Biochem. J.* **351**:527-535.
- Ponting, C. P., L. Aravind, J. Schultz, P. Bork, and E. V. Koonin.** 1999. Eukaryotic signalling domain homologues in archaea and bacteria. Ancient ancestry and horizontal gene transfer. *J. Mol. Biol* **289**:729-745.
- Poppe, M., S. M. Feller, G. Römer, and S. Wessler.** 2007. Phosphorylation of *Helicobacter pylori* CagA by c-Abl leads to cell motility. *Oncogene* **26**:3462–3472.
- Prinz, C., M. Schoniger, R. Rad, I. Becker, E. Keiditsch, S. Wagenpfeil, M. Classen, T. Rosch, W. Schepp, and M. Gerhard.** 2001. Key importance of the *Helicobacter pylori* adherence factor blood group antigen binding adhesin during chronic gastric inflammation. *Cancer Res.* **61**:1903-1909.
- Pukatzki, S., A. T. Ma, D. Sturtevant, B. Krastins, D. Sarracino, W. C. Nelson, J. F. Heidelberg, and J. J. Mekalanos.** 2006. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **103**:1528–1533.
- Rabel, C., A. M. Grahn, R. Lurz, and E. Lanka.** 2003. The VirB4 family of proposed traffic nucleoside triphosphatases: common motifs in plasmid RP4 TrbE are essential for conjugation and phage adsorption. *J. Bacteriol.* **185**:1045–1058.

- Rain, J. C., L. Selig, H. De Reuse, V. Battaglia, C. Reverdy, S. Simon, G. Lenzen, F. Petel, J. Wojcik, V. Schächter, Y. Chemama, A. Labigne, and P. Legrain. 2001. The protein-protein interaction map of *Helicobacter pylori*. *Nature* **409**:211–215.
- Rashkova, S., G. M. Spudich, and P. J. Christie. 1997. Characterization of membrane and protein interaction determinants of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB11 ATPase. *J. Bacteriol.* **179**:583–591.
- Rautemaa, R., H. Rautelin, P. Puolakkainen, A. Kokkola, P. Karkkainen, and S. Meri. 2001. Survival of *Helicobacter pylori* from complement lysis by binding of GPI-anchored protectin (CD59). *Gastroenterology* **120**:470–479.
- Rektorschek, M., D. Weeks, G. Sachs, and K. Melchers. 1998. Influence of pH on metabolism and urease activity of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* **115**:628–641.
- Ricci, V., C. Ciacci, R. Zarrilli, P. Sommi, M. K. R. Tummuru, C. D. Blanco, C. B. Bruni, T. L. Cover, M. J. Blaser, and M. Romano. 1996 Effect of *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cell migration and proliferation *in vitro*-role of VacA and CagA. *Infect. Immun.* **64**:2829–2833.
- Rieder, G., R. A. Hatz, A. P. Moran, A. Walz, M. Stolte, and G. Enders. 1997. Role of adherence in interleukin-8 induction in *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Infect Immun.* **65**:3622–3630.
- Rohde, M., J. Püls, R. Buhrdorf, W. Fischer, and R. Haas. 2003. A novel sheathed surface organelle of the *Helicobacter pylori* cag type IV secretion system. *Mol. Microbiol.* **49**:219–234.
- Romaniuk, P. J., B. Zoltowska, T. J. Trust, D. J. Lane, G. J. Olsen, N. R. Pace, and D. A. Stahl. 1987. *Campylobacter pylori*, the spiral bacterium associated with human gastritis, is not a true *Campylobacter* sp. *J Bacteriol.* **169**:2137–2141.
- Rost, B., R. Casadio, P. Fariselli, and C. Sander. 1995. Transmembrane helices predicted at 95% accuracy. *Protein Sci.* **4**:521–533.
- Rowland, M., D. Kumar, L. Daly, P. O'Connor, D. Vaughan, and B. Drumm. 1999. Low rates of *Helicobacter pylori* reinfection in children. *Gastroenterology* **117**:336–341.
- Saadat, I., H. Higashi, C. Obuse, M. Umeda, N. Murata-Kamiya, Y. Saito, H. Lu, N. Ohnishi, T. Azuma, A. Suzuki, S. Ohno, and M. Hatakeyama. 2007. *Helicobacter pylori* CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. *Nature* **447**:330–333.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487–491.
- Salaun, L., B. Linz, S. Suerbaum, and N. J. Saunders. 2004. The diversity within an expanded and redefined repertoire of phase-variable genes in *Helicobacter pylori*. *Microbiology* **150**:817–830.

- Saldinger, P.F., N. Porta, P. Launois, J. A. Louis, G. A. Waanders, H. Bouzourene, P. Michetti, A. L. Blum, and I. E. Corthésy-Theulaz.** 1998. Immunization of BALB/c mice with *Helicobacter* urease B induces a T helper 2 response absent in *Helicobacter* infection. *Gastroenterol.* **115**:891-89
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, T. Maniatis T.** 1989. *Molecular Cloning—A Laboratory Manual*, 2nd Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Satin, B., N. Norais, J. Telford, R. Rappuoli, M. Murgia, C. Montecucco, and E. Papini.** 1997. Effect of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin on maturation and extracellular release of procathepsin D and on epidermal growth factor degradation. *J. Biol. Chem.* **272**:25022-25028.
- Sayed, A., S. Matsuyama, and M. Inouye.** 1999. Era, an essential *Escherichia coli* small G-protein, binds to the 30S ribosomal subunit. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **264**:51–54.
- Schmidt-Eisenlohr, H., N. Domke, C. Angerer, G. Wanner, P. C. Zambryski, and C. Baron.** 1999a. Vir proteins stabilize VirB5 and mediate its association with the T pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **181**:7485–7492.
- Schmidt-Eisenlohr, H., N. Domke, and C. Baron, C.** 1999b. TraC of IncN plasmid pKM101 associates with membranes and extracellular high molecular weight structures in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**:5563–5571.
- Schmidt-Eisenlohr, H., M. Rittig, S. Preithner, and C. Baron, C.** 2001. Biomonitoring of pJP4-carrying *Pseudomonas chlororaphis* with Trb protein-specific antisera. *Environ. Microbiol.* **3**:720–730.
- Schmitt, W. and R. Haas.** 1994. Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported protein. *Mol. Microbiol.* **12**:307-319.
- Schrammeijer, B., A. den Dulk-Ras, A. C. Vergunst, J. E. Jurado, and P. J. Hooykaas.** 2003. Analysis of Vir protein translocation from *Agrobacterium tumefaciens* using *Saccharomyces cerevisiae* as a model: evidence for transport of a novel effector protein VirE3. *Nucleic Acids Res.* **31**:860-868.
- Schreiber, S., M. Konradt, C. Groll, P. Scheid, G. Hanauer, H. O. Werling, C. Josenhans, and S. Suerbaum.** 2004. The spatial orientation of *Helicobacter pylori* in the gastric mucus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**:5024-5029.
- Schreiber, S., M. Stüben, C. Josenhans, P. Scheid, and S. Suerbaum.** 1999. *In vivo* distribution of *Helicobacter felis* in the gastric mucus of the mouse: experimental method and results. *Infect. Immun.* **67**:5151-5156.
- Schröder, G. and E. Lanka.** 2005. The mating pair formation system of conjugative plasmids-A versatile secretion machinery for transfer of proteins and DNA. *Plasmid* **54**:1-25.
- Schulein, R., P. Guye, T. A. Rhomberg, M. C. Schmid, G. Schroder, A. C. Vergunst, I. Carena, and C. Dehio.** 2005. A bipartite signal mediates the transfer of type IV secretion

substrates of *Bartonella henselae* into human cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **102**:856-861.

Schultz, J., F. Milpetz, P. Bork, and C. P. Ponting. 1998. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**:5857-5864.

Scibelli, A., S. Roperto, L. Manna, L.M. Pavone, S. Tafuri, R. Della Morte, and N. Staiano. 2007. Engagement of integrins as a cellular route of invasion by bacterial pathogens. Vet. J. **173**:482-491.

Scott, D. R., E. A. Marcus, Y. Wen, J. Oh, and G. Sachs. 2007. Gene expression *in vivo* shows that *Helicobacter pylori* colonizes an acidic niche on the gastric surface. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **104**:7235-7240.

Segal, E. D. 1997. Consequences of attachment of *Helicobacter pylori* to gastric cells. Biomed. Pharmacother. **51**:5-12.

Segal, E. D., J. Cha, J. Lo, S. Falkow, and L. S. Tompkins. 1999. Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **96**:14559-14564.

Segal, E. D. and L. S. Tompkins. 1993. Transformation of *Helicobacter pylori* by electroporation. BioFeedback **14**:225-226.

Selbach, M., S. Moese, S. Backert, P. R. Jungblut, and T. F. Meyer. 2004. The *Helicobacter pylori* CagA protein induces tyrosine dephosphorylation of ezrin. Proteomics **4**:2961-2968.

Selbach, M., S. Moese, R. Hurwitz, C. R. Hauck, T. F. Meyer, and S. Backert. 2003. The *Helicobacter pylori* CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation. EMBO J **22**:515-528.

Sewald, X., B. Gebert-Vogl, S. Prassl, I. Barwig, E. Weiss, M. Fabri, R. Osicka, M. Schiemann, D.H. Busch, M. Semmrich, B. Holzmann, P. Sebo, and R. Haas. 2008. Integrin subunit CD18 is the T-lymphocyte receptor for the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. Cell Host Microbe **3**:20-29.

Sexton JA, Vogel JP. 2002. Type IVB secretion by intracellular pathogens. Traffic **3**:178-185.

Shamaei-Tousi, A., R. Cahill, and G. Frankel. 2004. Interaction between protein subunits of the type IV secretion system of *Bartonella henselae*. J. Bacteriol. **186**:4796-4801.

Sipponen, P., and B. J. Marshall. 2000. Gastritis and gastric cancer. Western countries. Gastroenterol. Clin. North Am. **29**:579-592.

Smythies, L.E., K. B. Waites, J. R. Lindsey, P. R. Harris, P. Ghiara, and P. D. Smith. 2000. *Helicobacter pylori*-induced mucosal inflammation is Th1 mediated and exacerbated in IL-4, but not IFN- γ , gene-deficient mice. J. Immunol. **165**:1022-1029.

- Sobala, G. M., J. E. Crabtree, M. F. Dixon, C. J. Schorah, J. D. Taylor, B. J. Rathbone, R. V. Heatley, and A. T. Axon.** 1991. Acute *Helicobacter pylori* infection: clinical features, local and systemic immune response, gastric mucosal histology, and gastric juice ascorbic acid concentrations. *Gut* **32**:1415-1418.
- Stephens, K., P. Hartzell, and D. Kaiser.** 1989. Gliding motility in *Myxococcus xanthus*: *mgl* locus, RNA, and predicted protein products. *J. Bacteriol.* **171**:819–830.
- Stingl, K., K. Altendorf, and E. P. Bakker.** 2002. Acid survival of *Helicobacter pylori*: how does urease activity trigger cytoplasmic pH homeostasis? *Trends Microbiol.* **10**:70-74.
- Suerbaum, S., and M. Achtman.** 1999. Evolution of *Helicobacter pylori*: the role of recombination [In Process Citation]. *Trends Microbiol.* **7**:182-184.
- Suerbaum S., and C. Josenhans,** 2007. *Helicobacter pylori* evolution and phenotypic diversification in a changing host. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**:441-452.
- Suerbaum, S., C. Josenhans, and A. Labigne.** 1993. Cloning and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* *flaB* flagellin genes and construction of *H. pylori* *flaA*- and *flaB*-negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange. *J. Bacteriol.* **175**:3278-3288.
- Suerbaum, S., and P. Michetti.** 2002. *Helicobacter pylori* infection. *N. Engl. J. Med.* **347**:1175-1186.
- Suerbaum, S., J. M. Smith, K. Bapumia, G. Morelli, N. H. Smith, E. Kunstmann, I. Dyrek, and M. Achtman.** 1998. Free recombination within *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **95**:12619–12624.
- Sundberg, C., L. Meek, K. Carroll, A. Das, and W. Ream.** 1996. VirE1 protein mediates export of the single-stranded DNA-binding protein VirE2 from *Agrobacterium tumefaciens* into plant cells. *J Bacteriol.* **178**:1207-1212.
- Sundberg, C. D., and W. Ream.** 1999. The *Agrobacterium tumefaciens* chaperone-like protein, VirE1, interacts with VirE2 at domains required for single-stranded DNA binding and cooperative interaction. *J Bacteriol.* **181**:6850-6855.
- Sundrud, M. S., V. J. Torres, D. Unutmaz, and T. L. Cover.** 2004. Inhibition of primary human T cell proliferation by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) is independent of VacA effects on IL-2 secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**:7727-7732.
- Suzuki, M., H. Mimuro, T. Suzuki, M. Park, T. Yamamoto, and C. Sasakawa.** 2005. Interaction of CagA with Crk plays an important role in *Helicobacter pylori*-induced loss of gastric epithelial cell adhesion. *J. Exp. Med.* **202**:1235-1247.
- Tammer, I., S. Brandt, R. Hartig, W. König, and S. Backert.** 2007. Activation of Abl by *Helicobacter pylori*: a novel kinase for CagA and crucial mediator of host cell scattering. *Gastroenterology* **132**:1309–1319.
- Tanaka, J., T. Suzuki, H. Mimuro, and C. Sasakawa.** 2003. Structural definition on the surface of *Helicobacter pylori* type IV secretion apparatus. *Cell Microbiol.* **5**:395–404.

- Terradot, L., N. Durnell, M. Li, M. Li, J. Ory, A. Labigne, P. Legrain, F. Colland, and G. Waksman.** 2004. Biochemical characterization of protein complexes from the *Helicobacter pylori* protein interaction map: strategies for complex formation and evidence for novel interactions within type IV secretion systems. *Mol. Cell. Proteomics* **3**:809–819.
- Thanassi, D. G.** 2002. Ushers and secretins: channels for the secretion of folded proteins across the bacterial outer membrane. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **4**:11–20.
- Thanassi, D. G. and S. J. Hultgren.** 2000. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**:420–430.
- Thompson, L. J., D. S. Merrell, B. A. Neilan, H. Mitchell, A. Lee, and S. Falkow.** 2003. Effect of growth phase and acid shock on *Helicobacter pylori* *cagA* expression. *Infect. Immun.* **71**:2643–2655.
- Tomb, J. F., O. White, A. R. Kerlavage, R. A. Clayton, G. G. Sutton, R. D. Fleischmann, K. A. Ketchum, H. P. Klenk, S. Gill, B. A. Dougherty, K. Nelson, J. Quackenbush, L. Zhou, E. F. Kirkness, S. Peterson, B. Loftus, D. Richardson, R. Dodson, H. G. Khalak, A. Glodek, K. McKenney, L. M. Fitzegerald, N. Lee, M. D. Adams, E. K. Hickey, D. E. Berg, J. D. Gocayne, T. R. Utterback, J. D. Peterson, J. M. Kelley, M. D. Cotton, J. M. Weidman, C. Fujii, C. Bowman, L. Watthey, E. Wallin, W. S. Hayes, M. Borodovsky, P. D. Karp, H. O. Smith, C. M. Fraser, and J. C. Venter.** 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **388**:539–547.
- Tran Van Nhieu, G., and R. R. Isberg.** 1993. Bacterial internalization mediated by beta 1 chain integrins is determined by ligand affinity and receptor density. *EMBO J* **12**:1887–1895.
- Tsutsumi, R., H. Higashi, M. Higuchi, M. Okada, and M. Hatakeyama.** 2003. Attenuation of *Helicobacter pylori* CagA SHP-2 signalling by interaction between CagA and C-terminal Src kinase. *J Biol Chem* **278**:3664–3670.
- Tsutsumi, R., A. Takahashi, T. Azuma, H. Higashi, and M. Hatakeyama.** 2006. Focal adhesion kinase is a substrate and downstream effector of SHP-2 complexed with *Helicobacter pylori* CagA. *Mol. Cell Biol.* **26**:261–276.
- Uetz, P., Y. A. Dong, C. Zeretzke, C. Atzler, A. Baiker, B. Berger, S. V. Rajagopala, M. Roupelieva, D. Rose, E. Fossum, and J. Haas.** 2006. Herpesviral protein networks and their interaction with the human proteome. *Science* **311**:239–242.
- Van den Berg, B., W. M. Clemons Jr., I. Collinson, Y. Modis, E. Hartmann, S. C. Harrison, and T. A. Rapoport.** 2004. X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* **427**:36–44.
- Van der Flier, A., and A. Sonnenberg.** 2001. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Research* **305**:285–298.
- Vergunst, A. C., B. Schrammeijer, A. den Dulk-Ras, C. M. de Vlaam, T. J. Regensburg-Tuink, and P. J. Hooykaas.** 2000. VirB/D4-dependent protein translocation from *Agrobacterium* into plant cells. *Science* **290**:979–982.

- Vergunst, A. C., M. C. van Lier, A. Dulk-Ras, T. A. Stuve, A. Ouwehand, and P. J. Hooykaas.** 2005. Positive charge is an important feature of the C-terminal transport signal of the VirB/D4-translocated proteins of *Agrobacterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A* **102**:832-837.
- Viala, J., C. Chaput, I. G. Boneca, A. Cardona, S. E. Girardin, A. P. Moran, R. Athman, S. Memet, M. R. Huerre, A. J. Coyle, P. S. DiStefano, P. J. Sansonetti, A. Labigne, J. Bertin, D. J. Philpott, and R. L. Ferrero.** 2004. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat. Immunol.* **5**:1166-1174.
- Vicari, J. J., R. M. Peek, G. W. Falk, J. R. Goldblum, K. A. Easley, J. Schnell, G. I. Perez-Perez, S. A. Halter, T. W. Rice, M. J. Blaser, and J. E. Richter.** 1998. The seroprevalence of cagA-positive *Helicobacter pylori* strains in the spectrum of gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology* **115**:50-57.
- Vieth, M. and M. Stolte.** 2006. Elevated risk for gastric adenocarcinoma can be predicted from histomorphology. *World J. Gastroenterol.* **12**:6109-6114.
- Vincent, C. D., J. R. Friedman, K. C. Jeong, E. C. Buford, J. L. Miller, and J. P. Vogel.** 2006. Identification of the core transmembrane complex of the *Legionella* Dot/Icm type IV secretion system. *Mol. Microbiol.* **62**:1278-1291.
- Vincent, C. D., and J. P. Vogel.** 2006. The *Legionella pneumophila* IcmS-LvgA protein complex is important for Dot/Icm-dependent intracellular growth. *Mol. Microbiol.* **61**:596-613.
- von Heijne, G.** 1995. Membrane protein assembly: Rules of the game. *BioEssays* **17**:25-30.
- Wada, T., J. C. Long, D. Zhang, and S. B. Vik.** 1999. A novel labeling approach supports the five-transmembrane model of subunit α of the *Escherichia coli* ATP synthase. *J. Biol. Chem.* **274**:17353-17357.
- Walker, M. M. and M. F. Dixon.** 1996. Gastric metaplasia: its role in duodenal ulceration. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **10 Suppl 1**:119-128.
- Wang, X., M. Bogdanov, and W. Dowhan.** 2002. Topology of polytopic membrane protein subdomains is dictated by membrane phospholipids composition. *EMBO J.* **21**:5673-5681.
- Wang, G., M. Z. Humayun, and D. E. Taylor.** 1999. Mutation as an origin of genetic variability in *Helicobacter pylori*. *Trends Microbiol.* **7**:488-493.
- Ward, D. V., O. Draper, J. R. Zupan, and P. C. Zambryski.** 2002a. Peptide linkage mapping of the *Agrobacterium tumefaciens* vir-encoded type IV secretion system reveals protein subassemblies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:11493-11500.
- Ward, D. V., J. R. Zupan, and P. C. Zambryski.** 2002b. *Agrobacterium* VirE2 gets the VIP1 treatment in plant nuclear import. *Trends Plant Sci.* **7**:1-3.
- Warren, J. R. and B. J. Marshall.** 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* **1**:1273-1275.

- Weeks, D. L., S. Eskandari, D. R. Scott, and G. Sachs.** 2000. A H⁺-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science* **287**:482-485.
- Weiss, A. A., F. D. Johnson, and D. L. Burns.** 1993. Molecular characterization of an operon required for pertussis toxin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:2970-2974.
- Wen, Y., E. A. Marcus, U. Matrubutham, M. A. Gleeson, D. R. Scott, and G. Sachs.** 2003. Acid-adaptive genes of *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **71**:5921-5939.
- Wotherspoon, A. C.** 1998. Gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue and *Helicobacter pylori*. *Annu. Rev. Med* **49**:289-299.
- Wulff-Strobel, C. R., A. W. Williams, and S. C. Straley.** 2002. LcrQ and SycH function together at the Ysc type III secretion system in *Yersinia pestis* to impose a hierarchy of secretion. *Mol. Microbiol.* **43**:411-423.
- Wunder, C., Y. Churin, F. Winau, D. Warnecke, M. Vieth, B. Lindner, U. Zahringer, H. J. Mollenkopf, E. Heinz, and T. F. Meyer.** 2006. Cholesterol glucosylation promotes immune evasion by *Helicobacter pylori*. *Nat. Med* **12**:1030-1038.
- Wyatt, J. I., B. J. Rathbone, G. M. Sobala, T. Shallcross, R. V. Heatley, A. T. Axon, and M. F. Dixon.** 1990. Gastric epithelium in the duodenum: its association with *Helicobacter pylori* and inflammation. *J Clin Pathol.* **43**:981-986
- Xiong, J.P., T. Stehle, R. Zhang, A. Joachimiak, M. Frech, S.L. Goodman, and M.A. Arnaout.** 2002. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science* **296**:151-155.
- Yamaoka, Y., M. Kita, T. Kodama, N. Sawai, K. Kashima, and J. Imanishi.** 1997. Induction of various cytokines and development of severe mucosal inflammation by cagA gene positive *Helicobacter pylori* strains. *Gut* **41**:442-451.
- Yamaoka, Y., D. H. Kwon, and D. Y. Graham.** 2000. A M(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:7533-7538.
- Yeo, H. J., S. N. Savvides, A. B. Herr, E. Lanka, and G. Waksman.** 2000. Crystal structure of the hexameric traffic ATPase of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system. *Mol. Cell* **6**:1461-1472.
- Yeo, H. J., Q. Yuan, M. R. Beck, C. Baron, and G. Waksman.** 2003. Structural and functional characterization of the VirB5 protein from the type IV secretion system encoded by the conjugative plasmid pKM101. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:15947-15952.
- Yip, C. K., and N .C. Strynadka.** 2006. New structural insights into the bacterial type III secretion system. *Trends Biochem. Sci.* **31**:223-230.
- Young, G. M., D. H. Schmiel, and V. L. Miller.** 1999. A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:6456-6461.

Yuan, Q., A. Carle, C. Gao, D. Sivanesan, K. Aly, C. Höppner, L. Krall, N. Domke, and C. Baron. 2005. Identification of the VirB4-VirB8-VirB5-VirB2 pilus assembly sequence of type IV secretion systems. *J. Biol. Chem.* **280**:26349–26359.

Zahrl, D., M. Wagner, K. Bischof, M. Bayer, B. Zavec, A. Beranek, C. Ruckenstein, G. E. Zarfel, and G. Koraimann. 2005. Peptidoglycan degradation by specialized lytic transglycosylases associated with type III and typeIV secretion systems. *Microbiology* **151**:3455–3467.

Zeaiter, Z., D. Cohen, A. Müsch, F. Bagnoli, A. Covacci, and M. Stein. 2007. Analysis of detergent-resistant membranes of *Helicobacter pylori*-infected cells reveals a role for MARK2/Par1b in CagA-mediated disruption of cellular polarity. *Cell Microbiol* **10**:781–794.

Zechner, E. L., F. De La Cruz, R. Eisenbrandt, A. M. Grahn, G. Koraimann, E. Lanka, G. Muth, W. Pansegrau, C. M. Thomas, B. M. Wilkins, and M. Zatyka. 1999. Conjugative DNA transfer processes. In: *The horizontal gene pool: bacterial plasmids and gene spread* (Thomas, C.M., Hrsg.), S. 87-174. Harwood Academic Publishers, Amsterdam.

Zheng, P.Y., and N. L. Jones. 2003. *Helicobacter pylori* strains expressing the vacuolating cytotoxin interrupt phagosome maturation in macrophages by recruiting and retaining TACO (coronin 1) protein. *Cell Microbiol.* **5**:25-40.

Zupan, J., T. R. Muth, O. Draper, and P. Zambryski. 2000. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *Plant J* **23**:11-28.

VII Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------|---|
| 3-AT | 3-Amino-1,2,4-Triazol |
| α - | anti- |
| μ | mikro (10^{-6}) |
| Abb. | Abbildung |
| Ade | Adenin |
| AK | Antikörper |
| Amp (AmpR) | Ampicillin (Ampicillinresistenz) |
| AMS | 4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonsäure |
| AP | Alkalische Phosphatase |
| AA | Aminosäure(n) |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BCIP | 5-Brom-3-chlor-3-indolylphosphat-p-toluidinsalz |
| Bp | Basenpaare |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| °C | Grad Celsius |
| CagA | Cytotoxin-assoziiertes Antigen A |
| Cam | Chloramphenicol |
| CD | “cluster of differentiation”, Oberflächenmarker |
| CM | zytoplasmatische (innere) Membran gramnegativer Bakterien |
| C-Terminus | carboxyterminaler Teil eines Proteins |
| dATP | Desoxyadenosintriphosphat |
| dCTP | Desoxycytidintriphosphat |
| dGTP | Desoxyguanosintriphosphat |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DO | <i>Dropout</i> -Supplement |
| dTTP | Desoxythymidintriphosphat |
| <i>et al.</i> | et aliter |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| ELISA | enzyme-linked immunosorbent assay |
| EtOH | Ethanol |
| FCS | Fetales Kälberserum |
| g | Gramm |
| GFP | Grün fluoreszierendes Protein |
| GST | Glutathion S-Transferase |
| h | hora, Stunde |
| His | Histidin |
| ICAM | “intercellular adhesion molecule”; interzelluläres Adhäsionsmolekül |
| IFN- γ | Interferon γ |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| kDa | Kilo-Dalton |
| Kan | Kanamycin |
| L | Liter |
| Leu | Leucin |
| Lsg. | Lösung |
| m | milli (10^{-3}), Meter |

| | |
|-----------------|--|
| M | Molar |
| max. | maximal |
| MALT | <i>mucosa-associated lymphoid tissue</i> |
| Met | Methionin |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| MMP | Magermilchpulver |
| MOI | <i>multiplicity of infection</i> ; Anzahl der Bakterien pro Wirtszelle |
| MPB | 3-(N-maleimidylpropionyl) biocytin |
| Mpf | <i>mating pair formation</i> -Komplex |
| NF-κB | Nukleärer Faktor kappa B |
| nm | nano (10^{-9}) |
| N-Terminus | aminoterminaler Teil eines Proteins |
| OD _x | Optische Dichte, gemessen bei einer Wellenlänge von x nm |
| OM | äußere Membran gramnegativer Bakterien |
| <i>orf</i> | <i>open reading frame</i> , offener Leserahmen |
| p. a. | pro analysis |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PAI | Pathogenitätsinsel |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| POX | Meerrettichperoxidase |
| P-Tyr | Phosphotyrosin |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | <i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute |
| RT | Raumtemperatur |
| SD | <i>synthetic dextrose</i> -Medium |
| s, sec. | Sekunde |
| SecYEG | heterotrimärer Proteinkomplex des generellen Protein-Sekretionswegs |
| Std. | Stunde |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SHP-2 | Tyrosinphosphatase mit SH2 (Src Homologieregion 2)-Domäne |
| Strep | Streptomycin |
| T4SS | Typ IV-Sekretionssystem(e) |
| Tab. | Tabelle |
| TEMED | N, N, N', N'-Tetramethyldiamin |
| TNF-α | Tumornekrosefaktor α |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| Trp | Tryptophan |
| U | Unit |
| UV | Ultraviolett |
| V | Volt |
| v/v | Volumen / Volumen |
| VacA | vakuolisierendes Zytotoxin A |
| W | Watt |
| wt | <i>wild type</i> , Wildtyp |
| w/v | Masse / Volumen |
| Yop | <i>Yersinia outer protein</i> |
| Y2H | <i>Yeast-Two-Hybrid</i> |

VIII Anhang

Gelbilder der PCRs zur Überprüfung der Mutanten $\Delta hp496$, $\Delta hp511$ und $\Delta hp513-519$

Mutante $\Delta hp496$

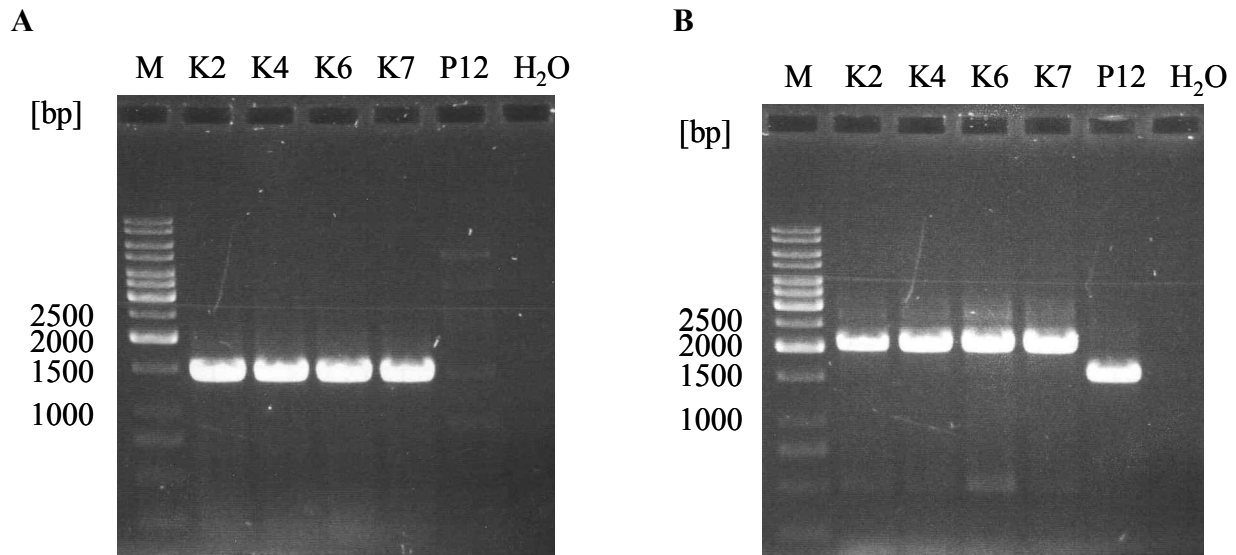


Abb. VIII.1: Überprüfung von $\Delta hp496$ Mutanten im Stamm P12 mittels PCR. Von jeweils 4 Klonen (K2, K4, K6, K7) wurde chromosomale DNA isoliert und eine PCR mit spezifischen Primern durchgeführt. **(A)** PCR mit dem Primerpaar RH136/SK2. **(B)** PCR mit dem Primerpaar SK1/SK2.

Das Primerpaar RH136/SK2 bindet einerseits in der *cat*-Resistenzgenkassette und andererseits im Chromosom, etwa 680 bp abwärts des Gens *hp496*. Bei der PCR mit diesen Primern werden die *cat*-Kassette (875 bp) und der abwärts gelegene Genbereich amplifiziert. Es entsteht ein 1555 bp großes Fragment. Wie aus **Abb.VIII.1A** ersichtlich zeigen alle 4 untersuchten Klone (K2, K4, K6 und K7) das zu erwartende Fragment, während die Kontroll-PCR mit P12-Wildtyp-DNA kein PCR-Produkt aufgrund fehlender Resistenzgenkassette aufweist. Auch im Kontrollansatz ohne DNA (H₂O) fand wie zu erwarten keine unspezifische Amplifikation statt. Zusätzlich wurde zum Ausschließen von *single cross-over*-Ereignissen noch eine 2. PCR über den gesamten auf- und abwärts-Bereich des Gens *hp496* mit den Primern SK1 (bindet 564 bp stromaufwärts) und SK2 (bindet 680 bp stromabwärts) durchgeführt (**Abb.VIII.1B**). Im P12-Wildtyp wird dabei ein PCR-Produkt von 1644 bp (564 bp+400 bp+680 bp) erzeugt, während in einer $\Delta hp496$ Mutante, in der das Gen gegen die Resistenzgenkassette ausgetauscht ist, ein Fragment von 2119 bp (564 bp+875 bp+680 bp) zu erwarten ist. Bei allen vier untersuchten Klonen ist das PCR-Produkt von 2119 bp sichtbar, während die P12-Kontrolle das kleinere Wildtyp-Fragment von 1644 bp aufweist. Im Kontrollansatz ohne DNA ist kein unspezifisches Amplifikat sichtbar (H₂O). Die Mutanten waren somit verifiziert und konnten für weitere Untersuchungen verwendet werden.

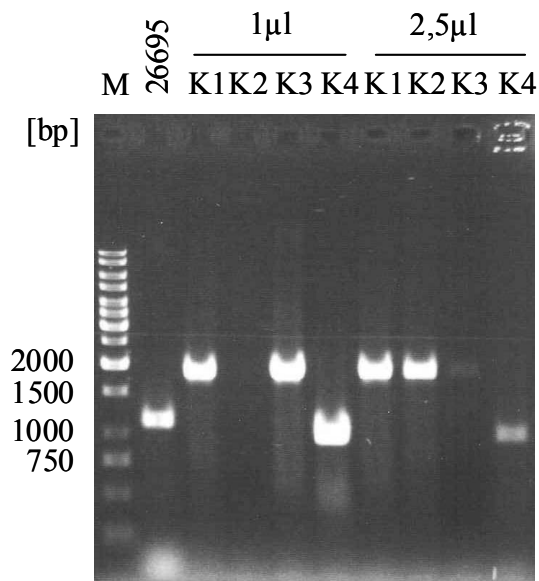
Mutante $\Delta hp511$:

Abb.VIII.2: Überprüfung von $\Delta hp511$ Mutanten im Stamm 26695 mittels PCR. Von vier Klonen (K1-K4) wurde chromosomale DNA isoliert und eine PCR mit den spezifischen Primern WS275/WS277 durchgeführt. Es wurden verschiedene DNA-Mengen (1 μ l bzw. 2,5 μ l) eingesetzt. Als Kontrolle diente chromosomale DNA des Wildtyp-Stammes 26695.

Die Überprüfung der Mutanten $\Delta hp511$ im Stamm 26695 erfolgte durch PCR des Genbereichs *hp0510-hp0512* mit den Primern WS275/WS277. **Abb.VIII.2** zeigt ein Agarosegel der PCR-Proben. Im Wildtyp ergibt sich ein Amplifikat von 1137 bp, während in den Mutanten das Gen durch die Resistenzgenkassette ausgetauscht ist und sich dadurch eine Größe von 1837 bp errechnet. Die korrekten Fragmentgrößen zeigten hierbei die Klone K1 bis K3 während der Klon K4 eine Amplifikatsgröße aufwies, die auch unterschiedlich zum Wildtyp war, und daher nicht weiter verwendet wurde.

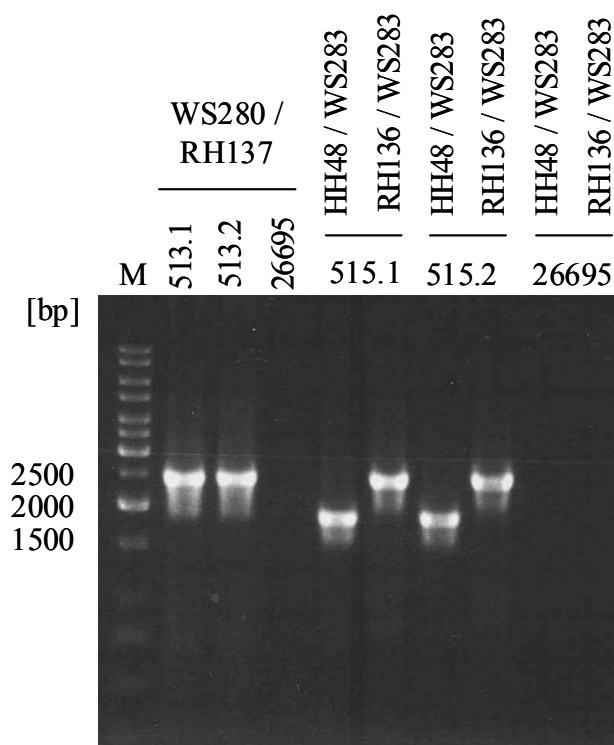
Mutanten $\Delta hp513$ und $\Delta hp515$:

Abb.VIII.3: Überprüfung von $\Delta hp513$ und $\Delta hp515$ Mutanten im Stamm 26695 mittels PCR. Von jeweils zwei Klonen wurde chromosomale DNA isoliert und eine PCR mit spezifischen Primern durchgeführt. Für die Mutanten im Gen *hp513* wurden die Primer WS280/RH137 verwendet, für die Mutanten $\Delta hp515$ die Primerpaare HH48/WS283 bzw. RH136/WS283. Als Kontrolle diente chromosomale DNA des Wildtyp-Stammes 26695.

Um die Korrektheit der Mutanten 26695 Δ *hp513* und 26695 Δ *hp515* zu ermitteln, wurden Primer ausgewählt, die einerseits in der Chloramphenicol-Resistenzgenkassette binden (RH136, RH137, HH48) und andererseits Primer außerhalb im Genom (WS280, WS283) verwendet. Dadurch sollte in den Mutanten ein Fragment definierter Größe amplifiziert werden, während mit Wildtyp-DNA kein Produkt aufgrund fehlender Resistenzkassette zu erwarten ist. Für die beiden überprüften Klone Δ *hp513.1* und Δ *hp513.2* ergibt sich wie aus **Abb.VIII.3** ersichtlich ein 2562 bp großes Fragment, das in der Spur mit 26695-Wildtyp-DNA nicht vorhanden ist. Beide Klone der Δ *hp515*-Mutante zeigen mit den Primern HH48/WS283 das zu erwartende 1861 bp große Fragment, mit dem Oligopaar RH136/WS283 das 2471 bp große Amplifikat. In den letzten beiden Spuren sind die beiden Kontroll-PCRs mit chromosomaler Wildtyp-DNA aufgetragen. Es ist kein unspezifisches Produkt mit beiden Primerpaaren vorhanden (**Abb.VIII.3**).

Mutanten Δ *hp516* und Δ *hp517*:

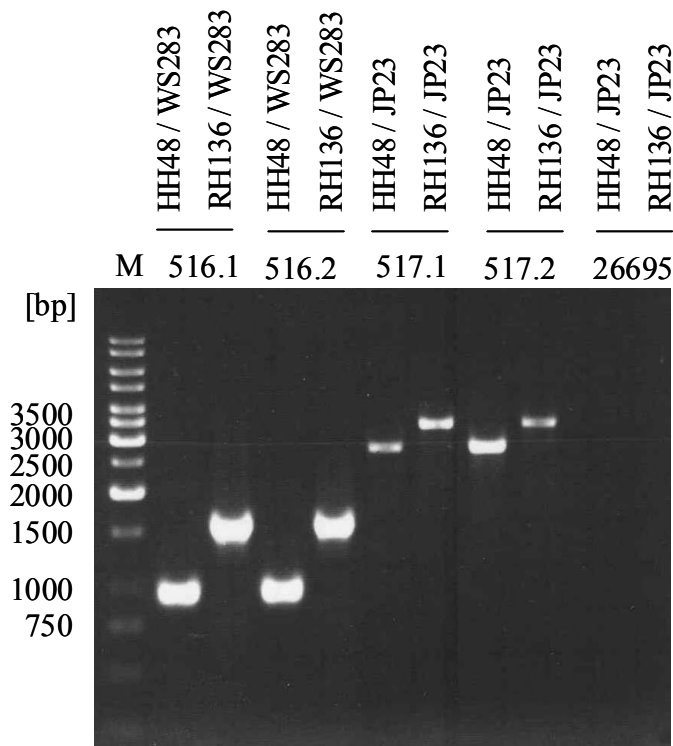


Abb.VIII.4: Überprüfung von Δ *hp516* und Δ *hp517* Mutanten im Stamm 26695 mittels PCR. Von jeweils zwei Klonen wurde chromosomale DNA isoliert und eine PCR mit spezifischen Primern durchgeführt. Für die Mutanten im Gen *hp516* wurden die Primer HH48/WS283 bzw. RH136/WS283 verwendet, für die Mutanten Δ *hp517* die Primerpaare HH48/JP23 bzw. RH136/JP23. Als Kontrolle diente chromosomale DNA des Wildtyp-Stammes 26695.

Die Überprüfung der Mutante 26695 Δ *hp516* erfolgte mittels PCR mit denselben Primerpaaren wie für die Mutante Δ *hp515*, HH48/WS283 und wie RH136/WS283. Es ergeben sich hier Fragmente der Größen von 982 bp und 1542 bp. Beide getesteten Klone zeigen PCR-Produkte mit der richtigen Größe (siehe **Abb.VIII.4**), während die Kontroll-PCR negativ bleibt (siehe **Abb.VIII.3**, letzte beiden Spuren). Von jeweils zwei Klonen des Stammes 26695 Δ *hp517*, Δ *hp517.1* und Δ *hp517.2*, wurden PCRs mit den Primerpaaren HH48/JP23 bzw. RH136/JP23 durchgeführt. Erwartete Fragmentgrößen sind hierbei 2695 bp und 3255 bp. Wie **Abb.VIII.4** verdeutlicht, zeigen beide Klone dieselben erwarteten Produktgrößen, während die Kontrollansätze mit chromosomaler 26695-DNA kein unspezifisches Amplifikat enthielten.

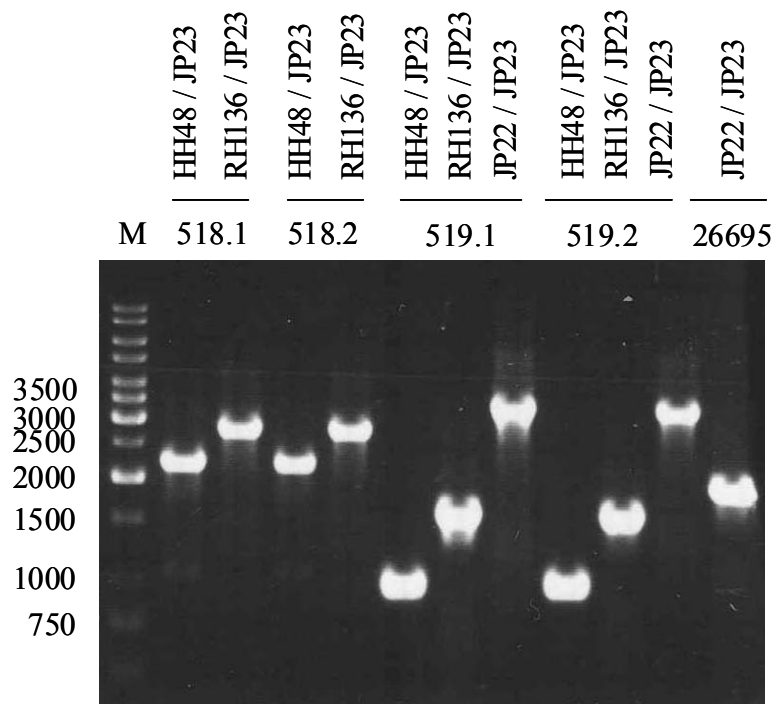
Mutanten $\Delta hp518$ und $\Delta hp519$:

Abb.VIII.5: Überprüfung von $\Delta hp518$ und $\Delta hp519$ Mutanten im Stamm 26695 mittels PCR. Von jeweils zwei Klonen wurde chromosomale DNA isoliert und eine PCR mit spezifischen Primern durchgeführt. Für die Mutanten im Gen *hp518* wurden die Primer HH48/JP23 bzw. RH136/JP23 verwendet, für die Mutanten $\Delta hp519$ die Primerpaare HH48/JP23, RH136/JP23 bzw. JP22/JP23. Als Kontrolle diente chromosomale DNA des Wildtyp-Stammes 26695.

Zur Verifizierung der Mutanten $\Delta hp518$ und $\Delta hp519$ konnten dieselben Primerpaare verwendet werden, wie schon bereits bei der Mutante $\Delta hp517$ (HH48/JP23 bzw. RH136/JP23, **Abb.VIII.4**). Die zu amplifizierenden Fragmentgrößen betrugen hier für die $\Delta hp518$ Mutante 2111 bp (HH48/JP23) und 2671 bp (RH136/JP23). Für die $\Delta hp519$ Mutante 1011 bp (HH48/JP23) und 1321 bp (RH136/JP23). Zusätzlich war noch ein weiteres Primerpaar zur Amplifikation des gesamten Genbereichs um *hp519* verfügbar (JP22/JP23). Während eine PCR mit diesen Primern und 26695 chromosomaler DNA ein Amplifikat von 1916 bp erzeugt, ergibt sich bei den $\Delta hp519$ Mutanten aufgrund der Transposoninsertion eine Fragmentgröße von 3386 bp. Wie man in **Abb.VIII.5** erkennt, wurden diese zu erwartenden Ergebnisse mit allen überprüften Klonen auch erzielt.

An dieser Stelle gilt mein herzlicher Dank

Herrn Prof. Dr. Anton Hartmann für die unkomplizierte Übernahme der Vertretung dieser Arbeit vor der Fakultät für Biologie der LMU.

Herrn Prof. Dr. Heinrich Jung, der freundlicherweise die Korrektur und die Erstellung des Zweitgutachtens übernahm.

Herrn Prof. Dr. Rainer Haas für die herzliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Möglichkeit, diese interessante Themenstellung bearbeiten zu dürfen und seine stete Diskussionsbereitschaft.

Mein ganz besonderer Dank gilt PD Dr. Wolfgang Fischer für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit, sein fortwährendes Interesse, die vielen Tipps und Anregungen bei neuen Ideen, aber vor Allem für sein offenes Ohr und seine Unterstützung zu jeder Zeit. Auch die gemeinsamen Unternehmungen außerhalb des Labors bleiben mir mit Freude in Erinnerung.

Allen aktuellen und ehemaligen „Haasen“ für das herzliche Arbeitsklima rund um das Labor und eine tolle Zeit in den letzten Jahren! Vor Allem Evelyn, die mir stets bereitwillig mit ausgegangenen Pufferlösungen („du weißt ja, wo sie stehen“) und methodischen Feinheiten den Laboralltag erleichterte und für viele nette Gespräche in „Inkubationspausen“ sorgte. Des Weiteren danke ich Sandra ganz herzlich, die in fachlichen und nicht fachlichen Angelegenheiten immer offen und gerne bereit für erheiternde Diskussionen war und für die unvergesslichen Erlebnisse mit Hefen, nicht nur im Labor. Nicht zuletzt Herbert, der mir in bren(n)zligen Situationen tatkräftig zur Seite stand.

Dr. Armin Baiker und Dr. Even Fossum für die kompetente Einführung in die hohen Weihen des *Yeast-Two-Hybrid*, sowie die Bereitstellung der Stempelapparatur und den Nachschub an Klonierungsvektoren.

Und natürlich ganz besonders meiner Partnerin Sabine für den Wiesnbesuch am ersten Arbeitstag und die wunderbare Zeit danach, sowie für ihre immerwährende Unterstützung und die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Meinen Eltern und meiner Schwester mit Familie, die mir in jeder Hinsicht und Lebenslage Halt geben und immer an mich glauben.